

Encapsulação dos carotenóides extraídos do repiso do tomate por *Spray drying*

Maria Margarida Silva Ferreira Lourenço

Dissertação para obtenção de Grau Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Paula Maria dos Reis Correia, Professora Adjunta da Escola Superior
Agrária do Instituto Politécnico de Viseu.

Agradecimentos

É com grande consideração que agradeço a todos os que direta ou indiretamente, contribuíram e me ajudaram na realização deste trabalho. Apesar do mesmo ser um trabalho individual, muitas foram as pessoas que, no desenvolvimento deste trabalho, contribuíram de alguma forma para o cumprimento de uma grande etapa da minha vida académica. Desta forma quero apresentar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Vítor Alves, por tudo o que me ensinou, pelo apoio, por toda a disponibilidade prestada e pela forma como me orientou no decorrer de todo este trabalho. Agradeço-lhe todas as sugestões durante a elaboração da dissertação de mestrado.

À Professora Margarida Moldão Martins, por me ter apresentado o tema, por tudo o que me ensinou e por todo o apoio na realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Luiz Corrêa, por estar sempre presente na realização de todas as fases deste trabalho, pela disponibilidade, orientação e simpatia. Reconheço, com gratidão, não só a confiança que depositaste em mim, mas também o sentido de responsabilidade que inculciste em mim em todas as fases deste projeto.

À Sofia Lourenço por me auxiliar sempre que precisei, por todos os conselhos e boa-disposição.

Ao Daniel Duarte e Diana Faria pela ajuda na parte laboratorial.

Ao Instituto Superior Técnico, principalmente à Engenheira Isabel Nogueira, pela disponibilidade nos ensaios de microscopia eletrónica de varrimento.

Às minhas grandes amigas Mariana Correia e Débora Filipa pela vossa amizade e pelo imprescindível apoio, palavra amiga e força que me deram sempre que precisei, quer nos bons quer nos maus momentos.

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam ao longo da minha vida académica, principalmente à Teresa Galamba de Oliveira, Carlos Teixeira, Kieza Santos, Mariana Bernardo, Fábio Silva, Nádia Figueiredo e Joana Prado.

À Tunassa, pois estiveram comigo ao longo destes cinco anos, sem vocês o meu percurso académico não teria sido a mesma coisa, muito obrigada pela vossa amizade e por todos os momentos partilhados.

Por último, agradeço a toda a minha família, especialmente aos meus pais, irmão, avó Natalina e à Hermelinda, pelo incentivo, apoio e confiança que sempre depositaram em mim. Pela paciência demonstrada nos bons e maus momentos e ainda pela ajuda na superação dos obstáculos ao longo desta caminhada.

Resumo

O repiso de tomate é um subproduto da indústria do processamento do tomate que possui uma elevada composição em compostos antioxidantes, essencialmente em carotenóides – licopeno e β -caroteno. Neste trabalho estudou-se o processo de microencapsulação do extrato etanólico de repiso de tomate por *Spray drying*, usando goma arábica como material encapsulante. Numa primeira abordagem estudou-se a microencapsulação de um carotenóide modelo (β -caroteno), usando a metodologia de superfície de resposta (RSM) com um desenho experimental rotacional composto com duas variáveis independentes (concentração de goma arábica e temperatura do ar de entrada). Deste estudo, selecionaram-se as temperaturas de 200 °C e 100 °C, com 35% de goma arábica, para efetuar o encapsulamento do extrato de repiso de tomate. As partículas obtidas pelo *Spray drying* foram caracterizadas em termos de morfologia e tamanho, grau de encapsulamento e atividade antioxidante dos carotenóides encapsulados.

As partículas de extrato de repiso de tomate concentrado com goma arábica à temperatura de 110 °C são, na sua maioria, pequenas ([5-10[μm) e colapsadas e a 200 °C são lisas e têm um tamanho superior ([25-95[μm).

Relativamente ao grau de encapsulamento, verificou-se uma diminuição com o aumento da temperatura. Quanto à atividade antioxidante do extrato encapsulado, esta diminuiu em relação ao extrato original (DPPH: 176, FRAP: 382 e ABTS: 314 mmol de trolox/ g de extrato). Porém, essa diminuição foi menor para a temperatura de 110 °C (DPPH: 8, FRAP: 13 e ABTS: 27 mmol de trolox/ g de extrato) em relação a 200 °C (DPPH: 47, FRAP: 44 e ABTS: 55 mmol de trolox/ g de extrato). A partir dos resultados obtidos conclui-se que, houve uma maior preservação dos carotenóides à temperatura de 110 °C e que a temperatura de 200 °C foi mais eficiente na manutenção da atividade antioxidante do extrato encapsulado.

Palavras-chave: Encapsulação, repiso de tomate, β -caroteno, *Spray drying*, goma arábica

Abstract

The tomato pomace is a by-product of the tomato processing industry that has a high composition in antioxidant compounds, mainly in carotenoids – lycopene and β -carotene. In this work the microencapsulation process of the tomato ethanolic extract by Spray drying, using gum arabic as encapsulating material, was studied. In a first approach the microencapsulation of a model carotenoid (β -carotene) was studied, using surface response methodology (RSM) with an experimental rotational design composed of two independent variables (gum arabic concentration and inlet air temperature). From this study, temperatures of 200 °C and 100 °C, with 35% gum arabic, were selected to effect the encapsulation of tomato extract. The particles obtained by Spray drying were characterized in terms of morphology and size, encapsulation degree and antioxidant activity of the encapsulated carotenoids.

The particles of tomato pomace extract with gum arabic at 110 °C are mostly small ([5-10[μ m) with concave surfaces and at 200 °C are smooth and have a larger size ([25-95[μ m).

Regarding the encapsulation degree, it was observed a decrease with the increase temperature. As for the antioxidant activity of the encapsulated extract, it decreased in relation to the original extract (DPPH: 176, FRAP: 382 and ABTS: 314 mmol trolox/g of extract). However, this decrease was lower for the temperature of 110 °C (DPPH: 8, FRAP: 13 and ABTS: 27 mmol of trolox/g of extract) than 200 °C (DPPH: 47, FRAP: 44 and ABTS: 55 mmol of trolox/g of extract). From the results obtained, it was concluded that there was a greater preservation of the carotenoids occurred at 110 °C and that the temperature of 200 °C was more efficient in maintaining the antioxidant activity of the encapsulated extract.

Keywords: Encapsulation, tomato pomace, β -carotene, Spray drying, gum arabic

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução.....	1
2. Enquadramento Teórico	3
2.1. Tomate	3
2.1.1. Origem.....	3
2.1.2. Importância económica	3
2.1.3. Morfologia	5
2.1.4. Composição	6
2.1.5. Processamento do tomate	12
2.2. Determinação da atividade antioxidante	15
2.3. Processo de encapsulação	18
3. Materiais e métodos	31
3.1. Obtenção do extrato de repiso de tomate	31
3.1.2. Caracterização do repiso de tomate em pó.....	31
3.1.2.1. Determinação da atividade antioxidante.....	31
3.1.3. Processo de extração dos compostos bioativos do repiso de tomate em pó.	34
3.2. Caracterização do extrato de repiso de tomate concentrado	35
3.2.1. Determinação da atividade antioxidante	35
3.2.2. Determinação dos carotenóides	35
3.3. Encapsulação de β -caroteno com goma arábica por <i>Spray drying</i>	36
3.3.1. Preparação das emulsões	38
3.3.2. Processo de encapsulação por <i>Spray drying</i>	38
3.3.3. Caracterização das micropartículas	38
3.3.3.1. Morfologia	38
3.3.3.2. Carregamento das partículas em β -caroteno	39
3.3.3.3. Atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado	39
3.4. Encapsulação do extrato de repiso do tomate concentrado com GA.....	40
3.4.1. Preparação das emulsões	40

3.4.2.	Processo de encapsulação através do <i>Spray drying</i>	41
3.4.3.	Caracterização das micropartículas	41
3.4.3.1.	Morfologia	41
3.4.3.2.	Carregamento das partículas em ERTC	41
3.4.3.3.	Determinação da atividade antioxidante do ERTC encapsulado	42
4.	Resultados e discussão	43
4.1	Caracterização do repiso de tomate em pó e do seu extrato.....	43
4.2.	Encapsulação de β -caroteno com goma arábica através do processo de <i>Spray drying</i>	44
4.2.1.	Processo de encapsulação por <i>Spray drying</i>	44
4.2.2.	Caracterização das micropartículas	46
4.2.2.1.	Morfologia e tamanho.....	46
4.2.2.2.	Carregamento das partículas em β -caroteno e eficiência de encapsulação.....	52
4.2.2.3.	Atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado	56
4.3.	Encapsulamento do extrato de repiso do tomate concentrado com goma arábica.....	57
4.3.1	Processo de encapsulação por <i>Spray drying</i>	57
4.3.2.	Caracterização das micropartículas	59
4.3.2.1.	Morfologia	59
4.3.2.2.	Carregamento das partículas em ERTC e eficiência de encapsulação	63
4.3.2.3.	Atividade antioxidante do ERTC encapsulado.....	65
5.	Conclusões e trabalho futuro	67
	Referências bibliográficas	69
	Anexos	I

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição de alguns compostos antioxidantes presentes no tomate.....	7
Tabela 2 – Composição química (%) do repiso do tomate	13
Tabela 3 – Composição de carotenóides no repiso de tomate.....	13
Tabela 4 – Ação do processo de <i>Spray drying</i> na produção das partículas	23
Tabela 5 – Delineamento experimental rotacional composto para o estudo da encapsulação de β -caroteno com goma arábica por <i>Spray drying</i>	37
Tabela 6 – Condições para o encapsulação de repiso de tomate concentrado com goma arábica.....	40
Tabela 7 – Condições de extração associadas a cada temperatura	41
Tabela 8 – Resultados das análises realizadas ao repiso em pó e ao extrato de repiso de tomate concentrado	43
Tabela 9 – Resultados de análises realizadas ao extrato de repiso de tomate seco segundo a literatura	44
Tabela 10 – Rendimento de secagem e quantidade de micropartículas associado a cada desenho experimental.....	45
Tabela 11 – Carregamento de partículas em β -caroteno e eficiência de encapsulação (%) associado a cada desenho experimental.....	52
Tabela 12 – Análise estatística ANOVA referente ao carregamento de partículas em	54
Tabela 13 – Atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado associado a cada desenho experimental.....	56
Tabela 14 – Rendimento de secagem associado a cada amostra	57
Tabela 15 – Grau e eficiência de encapsulação tendo em conta o licopeno encapsulado	63
Tabela 16 – Grau e eficiência de encapsulação tendo em conta o β -caroteno encapsulado	63
Tabela 17 – Valores de eficiência de encapsulação (%) segundo estudos realizados pela literatura.....	65
Tabela 18 – Atividade antioxidante do extrato antes e depois de ser encapsulado através do DPPH, FRAP e ABTS.....	65

Lista de Figuras

Figura 1 – Principais produtores de tomate a nível mundial	4
Figura 2 – Representação da área de cultivo (a) e produção de tomate para indústria (b) nos últimos anos.....	5
Figura 3 – Estrutura do tomate	6
Figura 4 – Estrutura química do licopeno.....	9
Figura 5 – Estrutura química do β -caroteno	11
Figura 6 – Estabilização do radical livre DPPH	16
Figura 7 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} ...	17
Figura 8 – Redução do radical ABTS ⁺ por parte dos antioxidantes	18
Figura 9 – Representação do processo <i>Spray drying</i>	20
Figura 10 – Tipos de micropartículas de acordo com a distribuição do composto ativo	28
Figura 11 – Morfologia dos diferentes tipos de micropartículas.....	28
Figura 12 – Imagens SEM das amostras 1 e 2 com igual %GA e diferente temperatura (ampliação 500x)	47
Figura 13 – Imagens SEM das amostras 3 e 4 com igual %GA e diferente temperatura (ampliação 500x)	47
Figura 14 – Imagens SEM das amostras 6,8 e 9 com diferentes %GA e a mesma temperatura (ampliação 500x)	48
Figura 15 – Imagens SEM das amostras 10 e 11 com igual %GA e diferente temperatura (ampliação 500x)	48
Figura 16 – Frequência relativa (barras) e frequência acumulada (linha) das amostras 1, 2, 3, 4, 6 e 8 observadas através das imagens SEM	50
Figura 17 – Frequência relativa (barras) e frequência acumulada (linha) das amostras 9,10 e 11 observadas através das imagens SEM	51
Figura 18 – Gráfico de RSM e equação respetiva relativa ao carregamento de partículas em β -caroteno	55
Figura 19 – Imagens SEM (35 % de concentração de GA e 110 °C de temperatura do ar de entrada). (A) partículas lisas e enrugadas (1000 x); (B) partícula enrugada (2000x) (C) corte seccional de uma partícula (2000x).....	59
Figura 20 – Imagens SEM (35 % de concentração de GA e 200 °C de temperatura do ar de entrada). (A) partículas lisas (500 x); (B) corte seccional de um partícula lisa oca (2000x) (C) corte seccional e parede de partícula lisa (2000x)	60

Figura 21 – Frequência relativa (barras) e frequência acumulada (linha) das micropartículas de ERTC com GA observadas através do SEM.....	62
Figura 22 – Imagens SEM das partículas equivalentes à temperatura de 110 °C (A) e à de 200 °C (B) (ampliação 500x)	62

Lista de Abreviaturas

ABTS	<i>2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid</i>
DPPH	<i>2, 2-dipheyl-1picrylhy-drazyl</i>
EAG	<i>Equivalente de ácido gálico</i>
EE	Eficiência de encapsulação
ERTC	Extrato de repiso de tomate concentrado
FRAP	<i>Ferric-Reducing Antioxidant Power</i>
GA	Goma arábica
Hlt	<i>Holding</i> da Indústria Transformadora de Tomate – Italagro e Fit
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
OCRAC	<i>Oxygen radical antioxidant capacity</i>
ROO	Radicais livres peroxil
RS	Rendimento de secagem
RSA	<i>Radical Scavenging Activity</i>
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TPTZ	<i>2, 4, 6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine</i>

1. Introdução

Atualmente os alimentos funcionais são muito importantes na dieta humana, uma vez que o seu consumo proporciona diversos benefícios para a saúde, o que está relacionado com a presença de uma grande quantidade de compostos bioativos que possuem atividade antioxidante.

Os compostos com atividade antioxidante têm um papel muito importante na saúde do consumidor e a nível tecnológico, visto que, para além de protegerem o corpo humano face aos radicais livres, inibem reações de oxidação que ocorrem durante o processamento e armazenamento dos produtos.

O tomate é um exemplo de um alimento que constitui uma ótima fonte de compostos antioxidantes e nutricionais que contribuem para a promoção da saúde humana (Gómez-Romero *et al.*, 2007; Bourguini & Torres, 2009; Luterotti *et al.*, 2015). Este vegetal tem sido alvo de diversos estudos e amplamente consumido a nível mundial, mas apesar de ser bastante consumido em fresco, a sua utilização incide maritariamente na forma de concentrado (Heuvelink, 2005).

O repiso de tomate (sementes e cascas do tomate), face aos subprodutos existentes, é o que é produzido em maior quantidade durante a produção de concentrado do tomate (Perretti *et al.*, 2013). Nutricionalmente este material é rico em nutrientes e em compostos bioativos, nomeadamente em carotenóides, sendo o principal constituinte o licopeno (Herrera *et al.*, 2010). É um subproduto muito instável e altamente degradável pela ação de fatores externos (elevadas temperaturas, luz, oxigénio, entre outros).

O processo de encapsulação tem sido usado na área alimentar como proteção dos compostos bioativos em relação aos fatores ambientais atrás referidos (Ray *et al.*, 2016). Existem vários processos de encapsulação, mas o mais utilizado é o método de secagem *Spray drying*. A escolha da matriz de encapsulação é um fator crucial no processo de encapsulação dos compostos bioativos. Existem vários tipos de biopolímeros que podem ser usados como materiais de parede, no entanto os mais usados pela técnica de secagem por atomização são polissacáridos como a goma árabica e o amido, e proteínas como as proteínas do leite (Gharsalloui *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2016).

A goma arábica, goma proveniente de várias espécies dos caules de árvores do género *Acacia*, é muito usada no processo de encapsulação uma vez que possui ótimas propriedades de emulsificação, o que permite aumentar a eficácia de encapsulação de compostos hidrofóbicos (Ali *et al.*, 2013; Gharsalloui *et al.*, 2007).

Considerando o que foi mencionado em cima, o objetivo geral deste trabalho incide no estudo da estabilização dos antioxidantes presentes no repiso de tomate, através do processo de *Spray drying*. Como tal, de forma a cumprir o objetivo proposto, foram definidos os seguintes objetivos:

- Obtenção do extrato de repiso de tomate concentrado;
- Caracterização do extrato de repiso de tomate concentrado;
- Estudo do processo de encapsulação de carotenóides com goma arábica usando β -caroteno como composto modelo;
- Encapsulação do extrato de repiso concentrado com goma arábica pelo processo de *Spray drying*.

Este trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos. A introdução que descreve em linhas gerais o trabalho realizado; o capítulo 2 que apresenta uma revisão bibliográfica sobre os principais temas desta dissertação de mestrado. O capítulo 3 que descreve os materiais e métodos utilizados, o capítulo 4 que apresenta os resultados do presente estudo, bem como a discussão dos mesmos e o capítulo 5 que apresenta as principais conclusões e sugestões de trabalhos futuros.

2. Enquadramento Teórico

2.1. Tomate

2.1.1. Origem

O tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) é um fruto de uma planta que provém de uma cultura hortícola, o tomateiro, que pertence à família *Solanaceae* e ao género *Lycopersicon* (Stajciv *et al.*, 2015; Heuvelink, 2005). Este vegetal é originário da costa ocidental da América Sul, mais concretamente do Peru e do Equador. Embora tenha tido origem nos países atrás referidos, foi no México que se iniciou a cultura do tomate. No século XVI este vegetal foi trazido para a Europa e em pouco tempo a sua cultura difundiu-se por diversos países (Jones, 2008a). A grande expansão mundial da cultura do tomate deu-se nas primeiras décadas do século XX, como resultado do desenvolvimento da indústria de processamento de concentrado de tomate.

2.1.2. Importância económica

O tomate é um vegetal muito usado em diversos estudos por ter um ciclo de vida curto, ser fácil de manipular e por ter um rápido crescimento. Por outro lado é muito consumido a nível mundial devido à sua composição nutricional benéfica para a saúde e também porque pode ser apresentado de diversas formas, tanto em fresco como em várias formas processadas (Heuvelink, 2005).

Atualmente o tomate é amplamente produzido na maioria dos países (Heuvelink, 2005) e é considerado a cultura hortícola mais importante, em termos de produção, a seguir à batata (Kalogeropoulos *et al.*, 2012; Torbica *et al.*, 2016).

De acordo com os dados disponibilizados pelo *Food and Agriculture Organization of United Nations Statistics Division*, a produção mundial de tomate, entre 2010 e 2013, aumentou cerca de 8%¹ e este aumento deveu-se sobretudo ao aumento da quantidade de terra destinada ao cultivo de tomate, visto que a quantidade de área cultivada aumentou cerca de 5%². Os sete principais produtores são a China, EUA, Egito, Índia, Itália, Turquia e Irão (Liedl *et al.*, 2013). A China, no decorrer do ano

¹Ano 2010: 152.082.961 ton e ano 2013: 164.492.970 ton

²Ano 2010: 4.543.167 ha e ano 2013: 4.762.457 ha

2013, foi o principal produtor, a sua produção correspondeu a cerca de 31% da produção mundial. A Índia foi o segundo maior com cerca de 11%, seguido pelos EUA, Turquia, Egito e Irão. A Itália foi o que menos produziu neste ano, visto que a sua produção correspondeu a 3% da produção mundial, tal como se pode observar na figura 1.

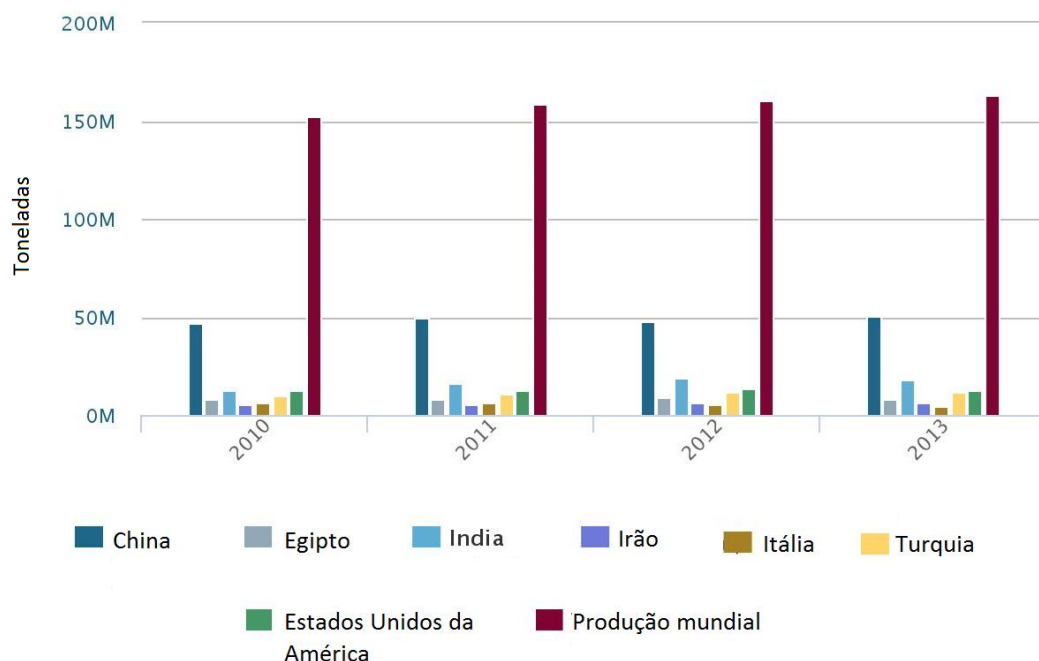


Figura 1 – Principais produtores de tomate a nível mundial

Fonte: FAOSTAT, 2016

Nos últimos anos tem-se registado um aumento da cultura de tomate como consequência do aumento do seu consumo como produto transformado (concentrado, ketchup, pasta, sumo, entre outros). Também Portugal, ao longo das últimas décadas, tem produzido cerca de 1.200.000 toneladas/ano de tomate para a indústria, mostrando melhorias consideráveis na produtividade (GPP, 2013). Isto pode-se comprovar, através das “Estatísticas agrícolas de 2014”. Portugal registou um grande aumento quer da área de cultivo de tomate para indústria, 19% face a 2013, quer da produção com o mesmo destino, 17% face a 2013, resultante de incentivos gerados pela indústria, como se pode constatar através da figura 2.

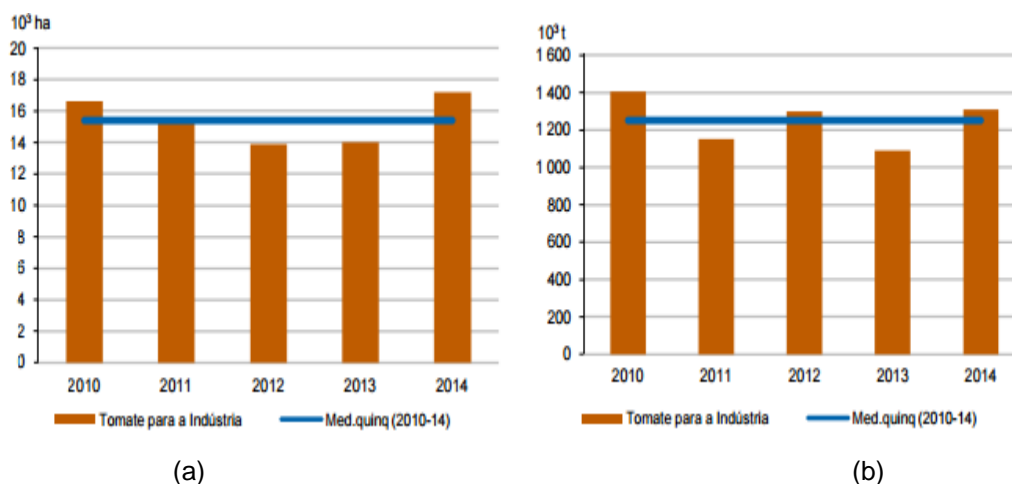


Figura 2 – Representação da área de cultivo (a) e produção de tomate para indústria (b) nos últimos anos

Fonte: INE, 2014

Portugal já é considerado o quinto maior produtor mundial de tomate para indústria, absorvendo esta, quase 90% da produção nacional (DRAPLVT, 2016). A cultura do tomate para indústria possui uma maior concentração na região do Alentejo e de seguida na Área Metropolitana de Lisboa, detendo respectivamente 78% e 21% do total da produção do Continente e em menor proporção no Centro (INE, 2014). A sua produção é assegurada na totalidade por Organizações de Produtores que se concentram, nomeadamente, no Ribatejo (80% da área), vale do Tejo (Azambuja e Santarém), no vale do Sorraia (Coruche e Salvaterra de Magos) e nos regadios do Alentejo (19% da área) (DRAPLVT, 2016).

2.1.3. Morfologia

O tomate é um fruto climatérico de uma planta herbácea (Heuvelink, 2005). Botanicamente, é uma baga carnuda de cor vermelha, constituída por pericarpo, columela ou placenta, que possui a cavidade locular ou lóculos e pelas sementes (figura 3). O pericarpo é composto pelo epicarpo (casca), mesocarpo e endocarpo. As sementes estão imersas na placenta, tecido esse que possui um gel, que preenche as cavidades loculares que podem ser constituídas por 2 a 12 lóculos.

O tamanho do tomate é influenciado por vários condicionantes, pelo grau de polinização (que condiciona desta forma o número de sementes que possui cada lóculo), o tipo de cultivar e por fatores externos, como a radiação solar e pela percentagem de água presente.

Quanto à coloração, a maioria do tomate possui cor vermelha, devido à presença do carotenóide – licopeno, no entanto o mesmo pode ter cor amarela, laranja ou verde, consoante o tipo de gene presente (Jones, 2008b).

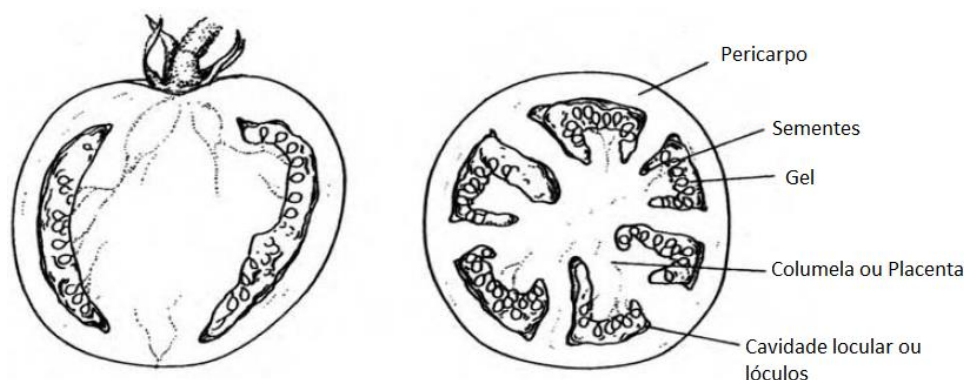


Figura 3 – Estrutura do tomate

Fonte: Jones, 2008b

2.1.4. Composição

O tomate é considerado um alimento funcional (George *et al.*, 2004) e é o segundo vegetal mais importante no mundo (Azabou *et al.*, 2016). Apesar deste fruto não ser muito rico em nutrientes ele é muito utilizado na dieta humana, devido aos seus benefícios para a saúde (Liedl *et al.*, 2013).

Relativamente à sua composição nutricional, em termos de macronutrientes o tomate possui grande quantidade de água (94%), de glúcidos (4%) e em menor quantidade lípidos (0,3%), sendo o ácido linoleico e os ácidos gordos polinsaturados os que se encontram em maior proporção. Embora o tomate não possua um elevado teor de macronutrientes, possui grandes quantidades de vitaminas e sais minerais e é uma excelente fonte de ácido ascorbico e também de potássio (Porto & Castro, 2007; Liedl *et al.*, 2013).

Por outro lado, o tomate é um fruto rico em compostos bioativos que contribuem para o seu valor nutricional e para a promoção da saúde, visto possuem compostos antioxidantes, como carotenóides (licopeno, luteína e β -caroteno), vitaminas (vitamina E e C) e compostos fenólicos (ácido caféico e quercetina, p.e.), (Gómez-Romero *et al.*, 2007; Bourguini & Torres, 2009; Luterotti *et al.*, 2015). No entanto o licopeno é o principal constituinte presente no tomate, apresentando muitos benefícios para a

saúde (Luterotti *et al.*, 2015), seguido da vitamina E e em menor percentagem o β -caroteno tal como se pode observar na tabela 1.

Tabela 1 – Composição de alguns compostos antioxidantes presentes no tomate

Compostos antioxidantes	Quantidade em mg/kg de peso seco
Licopeno	1013,2
β -caroteno	86,1
α - tocoferol (vitamina E)	159,7

Fonte: Kalogeropoulos *et al.*, 2012

Os antioxidantes são compostos ou sistemas que têm a capacidade de inibir ou retardar a oxidação de um determinado substrato (Borguini & Torres, 2009) e desta forma impedir que as moléculas vitais fiquem danificadas. A eficácia destes compostos está relacionada com as propriedades químicas e com a sua posição física dentro do alimento (Oroian & Escriche, 2015).

Os antioxidantes podem ser categorizados de acordo com o seu mecanismo de ação: antioxidantes primários, antioxidantes sinérgicos e antioxidantes secundários. Os primeiros têm a capacidade de estabilizar ou inativar os radicais livres, os segundos atuam como quelantes de oxigénio e de ROS impedindo a formação de peróxidos, detendo desta forma atividade redox e os últimos impedem a ocorrência da oxidação por decomposição dos peróxidos lipídicos em produtos finais estáveis (Gómez-Romero *et al.*, 2007).

Por outro lado, os antioxidantes podem ser classificados em diferentes classes de compostos, em carotenóides (carotenos como o licopeno e xantofilas), polifenóis (flavonóides, compostos fenólicos) e em vitaminas (vitamina C e vitamina E). Em geral estes compostos possuem diversas propriedades biológicas, por exemplo têm a capacidade de diminuir o aparecimento de doenças coronárias com a redução da concentração dos radicais livres, possuem efeitos anti-cancerígenos, anti-inflamatórios e anti-ateroscleróticos e permitem a manutenção da saúde do intestino através da alteração do equilíbrio microbiano intestinal (Oroian & Escriche, 2015).

Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais e lipossolúveis metabolizados por algas plantas e bactérias fotossintéticas responsáveis pela cor (vermelha, laranja e amarelo) de uma ampla diversidade de alimentos, frutas e vegetais, bem como de alguns animais (e.g. pássaros, insectos) (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

Estes compostos desempenham uma função essencial na proteção das plantas, face à foto-oxidação das mesmas (Borguini & Torres, 2009) e um papel importante na dieta por causa da atividade antioxidante da provitamina A (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014). Por outro lado, promovem a saúde humana, visto que diminuem o risco de doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares, cataratas e cancro e também porque protegem o sistema imunológico (Strati & Oreopoulou, 2014).

No que diz respeito à composição dos carotenóides presentes no tomate, pode ser afetada por diversos condicionantes, o tipo de clima e local geográfico de produção, tipo de cultivar e variedade do genótipo, variação sazonal, colheita e pós colheita, maturação, processamento e armazenamento (Preedy & Watson, 2008). No que diz respeito ao processamento térmico, alguns tipos de processos, como o branqueamento e o congelamento causam perda e degradação pouco significativa do licopeno presente no tomate (Shi & Le Maguer, 2010). Por outro lado, a esterilização apresenta excelentes efeitos nos carotenóides, uma vez que permite que os alimentos se mantenham estáveis durante um determinado período (Shi *et al.*, 2002).

Em termos de solubilidade, os carotenóides são moderadamente solúveis em hidrocarbonetos aromáticos e em óleos vegetais, muito solúveis em hidrocarbonetos clorados, como no clorofórmio e insolúveis em água (Shi *et al.*, 2002).

Os carotenóides podem ser agrupados em duas categorias com base nos seus grupos funcionais e constituição: em xantofilas, i.e, moléculas que contêm oxigénio na sua constituição e que são responsáveis pela cor amarela e castanha como a luteína, β -criptoxantina e a zeaxantina e em carotenos, moléculas não oxigenadas, com apenas uma cadeia de hidrocarbonetos que dão origem às cores desde o laranja até vermelho, como o α -caroteno, β -caroteno e o licopeno (Strati & Oreopoulou, 2014; Shi *et al.*, 2002).

No que diz respeito ao grupo dos carotenoides – carotenos e xantofilas presentes no tomate, o mesmo para além de possuir grande quantidade em licopeno (34 a 89%), possui ainda outros carotenóides, em menor quantidade, como α -caroteno e β -caroteno (precursor da vitamina A) (6 a 44%) e ainda luteína (1 a 9%) e β -criptoxantina (Shi *et al.*, 2002).

Licopeno

O licopeno é um pigmento que se encontra presente em diversos frutos, como no tomate, melancia, toranja, papaia, entre outros e tem múltiplas aplicações em diversas áreas (Poojary & Passamonti, 2015). Este composto é lipossolúvel e termoestável e é responsável pela cor vermelha do tomate, cor essa, que é usada como indicador da qualidade (Strati & Oreopoulou, 2014; Shi *et al.*, 2002).

O licopeno é o carotenóide que se encontra em maior quantidade no tomate (0,72-20 mg/100 g de tomate) em relação aos outros carotenóides, o que corresponde a 80-90% do total de carotenóides (Shi *et al.*, 2002). No entanto, a percentagem de licopeno no tomate depende de uma série de fatores, da variedade, da fase de maturação, do cultivo, das condições de crescimento e do processamento (Amiri-Rigi & Abbasi, 2016).

Relativamente à sua estrutura química, é um hidrocarboneto alifático, altamente poli-insaturado, composto por treze ligações covalentes duplas carbono-carbono, das quais onze são conjugadas e dispostas numa matriz linear, tal como representado na figura 4. As ligações duplas que o licopeno possui na sua constituição propulsionam a sua grande susceptibilidade à degradação oxidativa (Shi *et al.*, 2002).

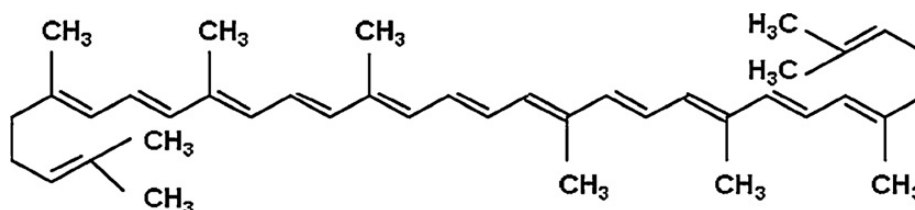


Figura 4 – Estrutura química do licopeno

Fonte: Zuorro, Fidaleo & Lavecchia, 2011

O licopeno possui uma elevada capacidade antioxidante, o que permite proteger desta forma as células dos danos oxidativos, e por sua vez prevenir e reduzir a ocorrência de doenças crónicas, como vários tipos de cancro, doenças degenerativas e doenças cardiovasculares (Capanoglu *et al.*, 2010; Ranvee *et al.*, 2013). As ligações duplas conjugadas, que este composto possui, permitem que o mesmo possua uma elevada atividade antioxidante (Shi *et al.*, 2002). A elevada atividade antioxidante deste composto, permite, desta forma, que o licopeno reaja eficientemente com o

oxigénio molecular (O_2), sequestrando-o e que elimine os radicais livres peroxil (ROO) (Stajic *et al.*, 2013).

Em termos de solubilidade é solúvel em solventes orgânicos como em hexano, acetona, etanol e em clorofórmio. No entanto é insolúvel em metanol e em água (Shi *et al.*, 2002).

Este composto é muito instável e as principais causas da sua instabilidade/degradação são a isomerização e a oxidação que ocorrem durante o processamento do tomate. Desta forma o tomate tem que ser protegido da luz, do oxigénio, das altas temperaturas, dos ácidos, das condições extremas de pH e das enzimas de degradação dos lípidos, visto que o mesmo é sensível a estes fatores.

O processamento do tomate promove o aumento da biodisponibilidade do licopeno, visto que o mesmo leva ao rompimento das paredes celulares do tomate. O que favorece por sua vez o enfraquecimento das ligações entre licopeno e matriz, tornando assim o licopeno mais disponível (Shi & Le Maguer, 2010).

Uma vez que a maior parte do processamento do tomate envolve aplicação de calor a altas temperaturas durante longos períodos de processamento, os produtos processados apresentam um predomínio de formas *cis* em relação aos produtos frescos que apresentam as formas *trans*, apresentando assim maior bioactividade (Shi *et al.*, 2002; Shi & Le Maguer, 2010).

O licopeno é utilizado em diversas áreas, na cosmética, na indústria alimentar e na indústria farmacêutica (Poojary & Passamonti, 2015). É considerado um pigmento muito importante no caso das indústrias farmacêuticas e alimentares, sendo que é utilizado como corante nutracêutico e natural (Shi *et al.*, 2002). No caso da indústria alimentar, o licopeno também é usado como aditivo alimentar por levar ao aumento do tempo de vida útil dos produtos alimentares e contribuir para o aumento dos benefícios alimentares, como a qualidade nutricional. Por outro lado é usado como corante alimentar natural, tal como foi dito anteriormente, por causa da sua coloração forte e por ser um composto solúvel em gordura e não tóxico (Poojary & Passamonti, 2015).

β-caroteno

O β-caroteno é um corante de cor vermelha/amarela que possui uma ótima fonte em pro-vitamina A e apresenta vários benefícios para a saúde (Coronel-Aguilera & San Martín-Gonzalez, 2015).

Este composto encontra-se presente em diversos frutos, como é o caso do tomate, no entanto é o principal carotenóide que se encontra presente em certos produtos como por exemplo na cenoura, manga damasco, nêspera (Rodriguez-Amaya, 2001).

Relativamente à sua constituição química, é constituído por dois grupos retinol (figura 5) (Rodriguez-Amaya, 2001; Grune *et al.*, 2010). As ligações duplas que possui levam a que este carotenóide seja um composto de elevado grau de insaturação, o que faz com que o mesmo seja susceptível à degradação térmica e à oxidação (Coronel-Aguilera & San Martín-Gonzalez, 2015).

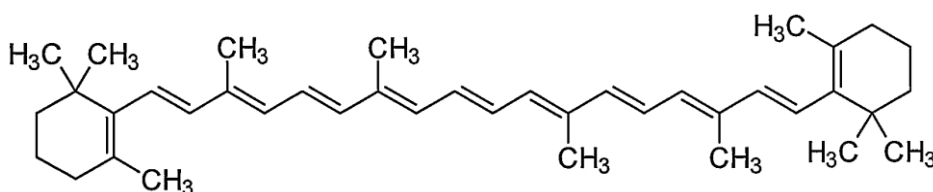


Figura 5 – Estrutura química do β-caroteno

Fonte:Perez, 2002

Este carotenóide possui uma elevada capacidade antioxidante, tal como o licopeno, o que permite prevenir o aparecimento de certas doenças como o cancro (Coronel-Aguilera & San Martín-Gonzalez, 2015).

Quanto à sua solubilidade, ele é solúvel em óleos (composto lipofílico) (Chen *et al.*, 2014) e em solventes orgânicos como em diclorometano (elevada solubilidade), acetato de etilo, acetona e etanol (Três *et al.*, 2007). No entanto é pouco solúvel em água (Coronel-Aguilera & San Martín-Gonzalez, 2015).

Em sistemas biológicos, por exemplo em frutas, as moléculas de β-caroteno encontra-se na forma de isómero *trans* (Grune *et al.*, 2010), no entanto quando submetido a altas temperaturas ocorrem reações de isomerização e a sua forma *trans* é rapidamente convertida em isómero-*cis*.

Este composto é susceptível à degradação química aquando do seu processamento alimentar e armazenamento (Chen *et al.*, 2014).

2.1.5. Processamento do tomate

O tomate, tal como foi dito anteriormente, é o fruto mais consumido a nível mundial e isto deve-se ao facto de poder ser consumido de diferentes formas, em fresco ou em diversas formas processadas (Heuvelink, 2005). Embora seja muito consumido em fresco, mais de 80% da sua utilização corresponde aos produtos processados, como sumo concentrado de tomate, puré, pastas, polpa, sopas, molhos, como ketchup e molho de pimentão, entre outros (Torbica *et al.*, 2016).

Repiso de tomate

Relativamente à produção de sumo concentrado de tomate, polpa, ketchup e de pasta, esta baseia-se no processo de concentração. Na produção destes quatro produtos as etapas de preparação do tomate, antes de iniciar o processamento, são as mesmas. O processo inicia-se com a descarga e transporte do tomate, seguindo-se uma lavagem e escolha. Depois de o tomate ser seleccionado e lavado, é triturado e submetido ao tratamento térmico (*hot break*). Após o tratamento térmico, ocorre a refinação, através de um conjunto de crivos, que permite que haja a separação da parte sólida – peles e sementes (repiso de tomate), da parte líquida (sumo). De seguida ocorre a concentração, no caso da pasta de tomate, ketchup e de polpa, são concentrados a partir da polpa de tomate e no caso do concentrado de sumo de tomate resulta da concentração do sumo de tomate por evaporação (Gould, 1992; Preedy & Watson, 2008).

Os produtos descritos anteriormente, entre outros, produzem grandes quantidades de subprodutos. No entanto, o repiso de tomate é o principal subproduto residual remanente produzido (Perretti *et al.*, 2013) e corresponde a cerca de 10-40% do tomate total processado (Strati & Oreopoulou, 2014). Este resíduo, tal como foi referido anteriormente, resulta da refinação e é constituído por 33% de sementes, 27% de cascas, 40% de polpa (Perretti *et al.*, 2013) e ainda por matéria fibrosa (Kaur *et al.*, 2006).

Em termos nutricionais as sementes e as cascas possuem uma elevada composição nutricional e potencial energético (Fogg *et al.*, 2015), são ricas em nutrientes e

compostos bioativos, como açúcares, fibra, proteínas, ácidos orgânicos, antioxidantes e vitaminas (Herrera *et al.*, 2010). No entanto o principal constituinte do repiso são os polissacáridos (fibra e pectina) (Farahnaky *et al.*, 2008), tal como se pode observar através da tabela 2. Por outro lado o repiso do tomate apresenta um teor de humidade de 71%, segundo um estudo realizado por Fuentes *et al.* (2013).

Tabela 2 – Composição química (%) do repiso do tomate

	Humidade	Proteína	Lípidos	Cinza	Glúcidos	Fibra
Repiso de tomate	71%	16%	2%	4%	32%	46%

Fonte: Adaptado Fuentes *et al.*, 2013

No que diz respeito ao conteúdo de carotenóides presente no repiso de tomate, possui uma elevada percentagem de licopeno na sua constituição, tal como se pode observar na tabela 3, visto que durante a maturação a camada mais externa da casca acumula grandes quantidades deste carotenóide (Zuorro *et al.*, 2011), o que faz com que apresente cinco vezes mais licopeno do que a polpa.

Por outro lado, a casca possui um elevado teor de humidade, o que leva a uma maior propensão à degradação microbiana e que condiciona, por sua vez, o seu processamento e armazenamento (Papaioannou & Karabelas, 2012). Uma das opções para preservar a casca fresca é a secagem, visto que previne a biodegradação (Kaur *et al.*, 2006), e posteriormente utilizá-la para extrair o licopeno (Perretti *et al.*, 2013).

Tabela 3 – Composição de carotenóides no repiso de tomate

Carotenóide	Quantidade em mg/kg de peso seco
Licopeno	413,7
β-caroteno	149,8

Fonte: Kalogeropoulos *et al.*, 2012

Tal como foi dito anteriormente são produzidas grandes quantidades de repiso de tomate durante o processamento industrial e hoje em dia este subproduto é descartado ou então é reutilizado como espessante na produção de ketchup, como hidrocolóide, de forma a melhorar a textura e a coloração do produto em si ou utilizado na alimentação animal (Poojary & Passamonti, 2015; Torbica *et al.*, 2016). No entanto, uma vez que este resíduo possui tomatina, um alcalóide que pode ser tóxico para cães, insectos e determinados herbívoros, a utilização na alimentação animal não

é considerada a melhor opção para a sua utilização (Fogg *et al.*, 2015). No entanto, dado que possui muito licopeno na casca, a sua utilização pode ser sustentável, promissora e de reduzido custo no desenvolvimento de produtos funcionais, contribuindo desta forma para a criação de produtos de alto valor acrescentado (Poojary & Passamonti, 2015; Torbica *et al.*, 2016).

Extração dos compostos bioativos do repiso de tomate

A extração é uma técnica que se fundamenta na preparação da amostra e pode ser realizada através de vários métodos, que por sua vez são classificados consoante a origem da amostra e as fases extratoras (Chen & Urban, 2015). O método de extração mais utilizado é a extração sólido-líquido.

A extração sólido-líquido baseia-se na separação dos componentes de uma matriz sólida de acordo com a sua solubilidade no líquido usado como solvente de extração. Este tipo de extração, também designado por extração com solvente de amostras sólidas é utilizado para separar e remover substâncias insolúveis a partir de compostos de elevado peso molecular (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

A extração com solventes pode ser realizada através de diversas técnicas de extração, contudo o tipo de solvente, o composto alvo e a temperatura influenciam a escolha do método a utilizar.

As principais técnicas usadas para a extração dos carotenóides, no caso dos subprodutos do tomate, são a extração por *Soxhlet* e a agitação. O processo de extração através do *Soxhlet* é o mais utilizado e mais eficaz. No entanto o seu desempenho na extração dos compostos termolábeis é reduzida, o tempo de extração é mais demorado e são utilizadas grandes quantidades de solventes, podendo haver desta forma decomposição térmica dos carotenóides, uma vez que o composto em estudo é extraído no ponto de ebulição do solvente durante muito tempo (Strati & Oreopoulou, 2014). Por outro lado, a metodologia deste tipo de extração é muito simples e permite extrair maior quantidade de amostra (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010). Este processo inclui uma série de etapas que permitem que a amostra seja extraída uma série de vezes até que a extração esteja concluída.

No entanto, o licopeno, presente no tomate, pode ser extraído através de outras técnicas de extração, por fluído supercrítico (dióxido de carbono), cromatografia, extração assistida por ultra-sons, extração de ultra-sons/extracção assistida por

microondas, por extração enzimática assistida e ainda por inclusão selectiva em ácido desoxicólico (Shi *et al.*, 2002; Poojary & Passamonti, 2015).

Os solventes orgânicos mais frequentes para extrair os carotenóides do tomate são o n-hexano, acetona, etanol, acetato de etilo, clorofórmio, éter de petróleo e o tetra-hidrofurano. No entanto, a mistura de solventes de hexano/acetona ou uma mistura de hexano/acetona/etanol também é frequentemente utilizada, uma vez que ao extrair o licopeno com estas misturas, a capacidade de recuperação e de estabilização do mesmo é maior em relação a outros solventes (Poojary & Passamonti, 2015).

Apesar de existirem vários solventes de extração para extrair os carotenóides presentes no tomate, apenas alguns é que podem ser usados no processamento alimentar segundo a Directiva nº 2009/32/CE, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros sobre os solventes de extracção utilizados no fabrico de géneros alimentícios e dos respectivos ingredientes, como acetato de etilo, etanol e acetona.

2.2. Determinação da atividade antioxidante

Existem diferentes métodos para medir a atividade antioxidante dos compostos. Esses métodos podem ser baseados em distintos mecanismos químicos e biológicos, através da redução de um metal férrico, como o FRAP, na eliminação de radicais orgânicos livres, como o ABTS ou DPPH, na capacidade de absorção do radical oxigénio, como o OCRAC, entre outros (Musa *et al.*, 2013; Rufino *et al.*, 2007a).

A atividade antioxidante equivalente em Trolox (TEAC - *Trolox equivalent antioxidant capacity*) é amplamente utilizada na quantificação dos radicais livres que são capturados por parte de um antioxidante e é utilizado pelos métodos abaixo descritos para determinar a capacidade antioxidante (Arts *et al.*, 2004).

Método baseado na captação do radical de DPPH

Este método traduz-se na captura, por parte de antioxidantes, do radical livre de DPPH (2,2-dipheyl-1picrylhy-drazyl) (Rufino *et al.*, 2007a). O DPPH forma um radical livre estável que possui uma cor púrpura e é monitorizado através de uma banda de absorção por espectrofotometria na gama entre 515-520 nm (Carmona-Jiménez *et al.*, 2014). Este radical forma-se através da dissolução do reagente em meio orgânico (Rufino *et al.*, 2007a), em que o DPPH• de cor violeta escuro é reduzido e convertido

numa molécula mais estável de DPPH, havendo desta forma a passagem de violeta escuro para um tom violeta claro, até amarelo pálido (Musa *et al.*, 2013), tal como se pode observar através da figura 6.

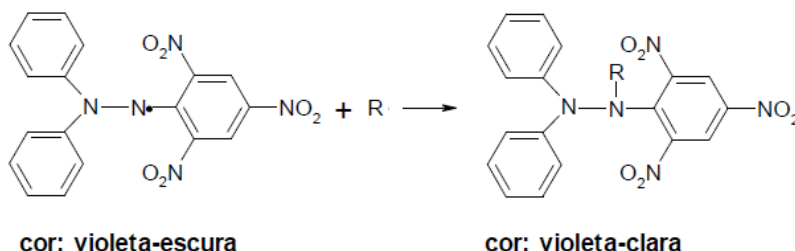


Figura 6 – Estabilização do radical livre DPPH

Fonte: Rufino *et al.*, 2007a

No que diz respeito ao consumo de radicais livres do DPPH, que decorre durante a reação dos compostos antioxidantes, quanto maior for o consumo dos radicais livres do DPPH, por parte dos compostos, menos cor púrpura existe na amostra. Por outro lado, quanto maior for a quantidade de radical consumido, maior é a capacidade antioxidante da amostra e por sua vez menor a absorvância medida através do espectrofotómetro a 515 nm (Carmona-Jiménez *et al.*, 2014).

Este método, em comparação com outros, é simples, muito rápido, tem um custo reduzido e utiliza pouco reagente. Opera segundo condições experimentais ligeiras, o que é uma vantagem face a outros métodos que necessitam de tratamento preliminar da amostra, como por exemplo de altas temperaturas. Por outro lado, não depende da polaridade da amostra e não necessita de preparação especial e de equipamento complexo. No entanto o método de DPPH é afetado por alguns condicionantes como o teor de água, a quantidade de solvente e pela concentração de iões de hidrogénio (Musa *et al.*, 2013).

Método de FRAP

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power* – Poder antioxidante de redução do ferro) tem por base uma reacção redox entre um substrato (que possui poder antioxidante) e o ião Fe^{3+} . Esta redução é quantificada por espectrofotometria através da mudança de cor da solução com um complexo de Fe^{3+} com TPTZ (2,4,6-tris (2pyridyl)-s-triazina) que se torna azul e absorve a radiação eletromagnética num comprimento de onda de 595 nm (Bolanos de la Torre *et al.*, 2015).

Quando o complexo $\text{Fe}^{3+}\text{TPTZ}$ é colocado num meio com pH baixo, o complexo é reduzido e dá origem à forma ferrosa (Fe^{2+}). Esta reação permite que ocorra a alteração da cor azul claro a azul-escuro, tal como se encontra representado na figura 7.

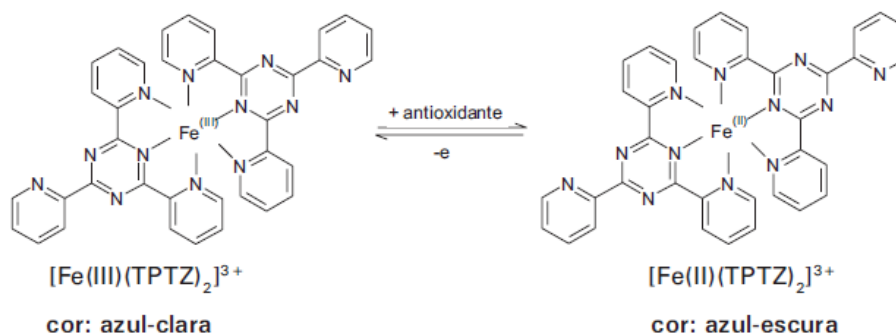


Figura 7 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}
Fonte: Rufino *et al.*, 2006

A variação da absorvância, que é medida através do espectrofotómetro, está relacionada com o potencial de redução, no qual os electrões são doados aos antioxidantes presentes na reação. Por outro lado, a alteração da coloração que ocorre na reação, varia de acordo com a atividade antioxidante do composto, quanto maior for atividade antioxidante mais escura é a solução (Rufino *et al.*, 2006).

Método baseado na captação do radical de ABTS

O método ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) consiste na redução do radical ABTS^+ por parte dos antioxidantes que se encontram presentes na amostra em estudo. Neste método, o radical ABTS^+ , obtido através da oxidação do ABTS com o persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), quando se encontra na presença de antioxidantes é reduzido e a sua coloração passa de verde-azulado para verde-azulado mais claro, tal como se pode observar na figura 8. Esta reação é quantificada por espectrofotometria na gama de comprimento de onda de 734 nm e traduz-se na redução da sua absorvância por parte dos antioxidantes presentes (Zulueta *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2016).

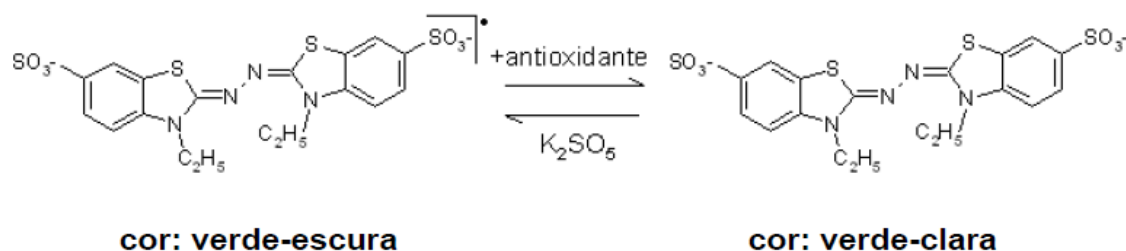


Figura 8 – Redução do radical ABTS^{•+} por parte dos antioxidantes

Fonte: Rufino et al., 2007b

Este método não é dispendioso, tem por base uma reação rápida, visto que demora só seis minutos a reagir e é estável ao pH. No entanto, não é padronizado e por isso não se podem comparar os valores obtidos entre laboratórios e o radical ABTS não é estável durante longos periodos de tempo (Zulueta *et al.*, 2009; Rufino *et al.*, 2007b).

2.3. Processo de encapsulação

Tal como foi dito anteriormente, o licopeno presente no tomate detém de uma elevada atividade antioxidante. No entanto este carotenóide é susceptível a reações de oxidação, na presença de oxigénio, aquando do seu armazenamento. O método de encapsulação tem sido usado no sector alimentar como estratégia eficaz na estabilização dos compostos bioativos, como o licopeno, contra fatores externos como o oxigénio, luz, radicais livres, durante o armazenamento dos alimentos (Ray *et al.*, 2016).

A encapsulação consiste num processo em que as partículas ou gotículas do material a encapsular (*raw material*) são envolvidas por um revestimento através de uma matriz encapsulante (*wall material*) homogénea ou heterogénea, com o objetivo de se formarem pequenas partículas – micropartículas (Poshadri & Kuna, 2010).

Este método permite conservar eficazmente os compostos bioativos como os antioxidantes, vitaminas, minerais, péptidos, lípidos, ácidos gordos e prebióticos (Ray *et al.*, 2016) e tem inúmeras aplicações na agricultura, na indústria farmacêutica, alimentar, têxtil e em biotecnologia.

No ramo alimentar, a encapsulação é muito utilizado (Poshadri & Kuna, 2010) e apresenta vários benefícios no que diz respeito aos ingredientes alimentares que vão ser encapsulados (Fernandes *et al.*, 2014), e por sua vez permite proteger os mesmos

das perdas voláteis, da deterioração, e da interação prematura em relação a outros ingredientes.

Segundo Poshadri & Kuna (2010) e Ray *et al.* (2016) a utilização do método de encapsulação na indústria alimentar permite:

- Reduzir a reactividade do núcleo da micropartícula face aos fatores ambientais;
- Diminuir a taxa de transferência do material do núcleo para o ambiente exterior;
- A manipulação dos alimentos mais facilmente;
- Melhorar a solubilidade do núcleo;
- Estabilizar os ingredientes alimentares e aumentar a sua biodisponibilidade;
- Aprovisionar o material do núcleo;
- Mascaram sabores e odores indesejáveis;
- Reduzir a degradação e a evaporação de compostos voláteis do aroma;
- Diluir o material do núcleo quando este é usado em porções muito pequenas.

Existem diversas formas de encapsulação que diferem de acordo com as especificações e adaptações e a sua seleção está relacionada com as propriedades químicas e físicas do composto a encapsular e do revestimento (*wall material*), com o tipo de produto encapsulado (tamanho e forma) a obter (Estevinho *et al.*, 2013). Os processos de encapsulação podem ser processos físicos como o *Spray drying*, secagem em leito de pulverização (*Spray-bed-drying*), *Spray-chilling*, revestimento de leito liofilizado (*Fluid-bed coating*), *Spray-colling*, liofilização (*Freeze-drying*), entre outros, ou processos químicos como a coacervação, co-cristalização, polimerização interfacial, inclusão molecular, incorporação por lisossomas (*Liposomal entrapment*), entre outros (Poshadri & Kuna, 2010).

No entanto, o *Spray drying*, também designado por secagem por atomização, é o método mais utilizado na indústria alimentar devido ao seu reduzido custo, aliado à sua eficiência e à sua disponibilidade no mercado e também por ser um processo rápido e reprodutível, quando comparado com outros métodos (Estevinho *et al.*, 2013).

Spray drying

O *Spray drying* é o método de encapsulação mais antigo e mais utilizado há várias décadas na indústria alimentar (Gharsallaoui *et al.*, 2007). O mesmo foi descoberto em 1937 por Boake Roberts e desde então que se tem tornado o processo ideal para a encapsulação de aromas secos (Poshadri & Kuna, 2010). Desde o seu surgimento que é aplicado na secagem de suspensões sólidas e na proteção dos sabores contra a

oxidação ou degradação, no entanto hoje em dia também é usado no aprovisionamento de compostos biativos e de probióticos (Estevinho *et al.*, 2013). Por outro lado é importante na preservação do valor nutricional das vitaminas e permite proteger, estabilizar e solubilizar os compostos bioativos (Ray *et al.*, 2016).

Este método baseia-se na atomização de um líquido, seguido de uma secagem através de uma corrente de ar quente de forma a formar micropartículas sólidas, partículas em pó, de tamanho pequeno (Estevinho *et al.*, 2013) tal como se pode observar através da figura 9. A alimentação inicial pode ser uma emulsão, uma solução ou uma suspensão e os gases mais utilizados na secagem são o ar ou um gás inerte (azoto) (Gharsallaoui *et al.*, 2007). O tipo de produto final obtido depende das condições operacionais, das propriedades físicas e químicas da alimentação e do secador. Desta forma o tamanho das partículas varia entre 10-50 μm (pó muito fino) e entre 2-3 mm (partículas de tamanho grande) e são separadas através de um ciclone aquando da sua formação (Estevinho *et al.*, 2013).

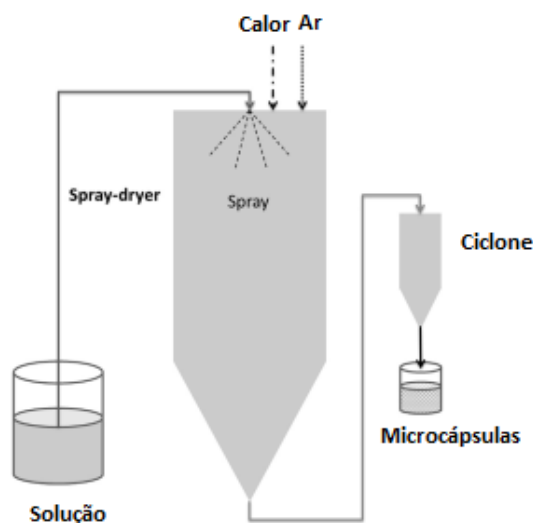


Figura 9 – Representação do processo *Spray drying*

Fonte: Estevinho *et al.*, 2013

A encapsulação por *Spray drying* é composto essencialmente por duas fases: preparação da dispersão ou emulsão e o processo de encapsulação propriamente dito (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A preparação da emulsão é uma etapa essencial na encapsulação e consiste na produção de uma emulsão, que é obtida a partir da mistura do material do núcleo ativo (*raw material*) com o material de parede (*wall material*) (Murugesan & Orsat, 2012). A emulsão, para ser atomizada, tem que ser preparada através da mistura um *raw material* que é normalmente de natureza hidrofóbica juntamente com um *wall material*

imiscível (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Antes de realizar a atomização da emulsão, a mesma deve ser estável, as gotículas devem ter tamanho reduzido e a viscosidade baixa, com o intuito de não ocorrer inclusão de ar nas partículas. As etapas de atomização e de desidratação das partículas decorrem ao mesmo tempo, tal como foi dito anteriormente (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

As condições de funcionamento do processo de secagem por atomização são imprescindíveis para uma boa eficiência de encapsulação e todas as etapas integrantes podem afetar o funcionamento, tal como as propriedades das micropartículas que se formam. Assim, diversos fatores têm que ser tidos em conta como (Masters, 1972; Keshani *et al.*, 2015):

- A velocidade do ar de secagem;
- Temperatura do ar de entrada e de saída;
- Caudal de alimentação;
- Composição da alimentação;
- Propriedades reológicas da alimentação;
- Tipo de atomizador.

Fases do processo de Spray drying

O processo de *Spray drying* é composto por quatro etapas: atomização, contacto das partículas com o ar quente, evaporação da água das partículas e separação do produto seco do ar húmido (Masters, 1972). Cada fase do processo é tida em conta de acordo com a concepção e com o funcionamento do secador e também está relacionado com as propriedades químicas e físicas e do caudal de alimentação, o que influencia as características do produto obtido.

Atomização

Nesta fase é realizada a atomização do líquido em pequenas gotículas por pressão ou por energia centrífuga através de um atomizador, capaz de obter uma fina pulverização do líquido. A formação da pulverização (*spray*) e o contacto da pulverização com o ar são os princípios básicos desta etapa. O objetivo desta fase consiste em obter uma superfície máxima de transferência de calor entre o ar seco e o líquido, com o intuito de melhorar a transferência de calor e de massa (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A escolha e a operação do atomizador é imprescindível na obtenção de produtos de elevada qualidade. A seleção do tipo de atomizador a utilizar está relacionada com a origem, composição e viscosidade do líquido de alimentação e com as características pretendidas para o produto final. São utilizados atomizadores rotacionais, atomizadores bocais (*nozzles*) e recentemente atomizadores bocais de dois fluidos (Masters, 1972).

Desta etapa obtém-se grandes quantidades de líquido em gotículas na forma de aerosol (Masters, 1972).

Contacto das gotículas com o ar quente

A fase de secagem consiste no contacto das gotículas com o ar quente; e tem início durante a fase de atomização (Gharsallaoui *et al.*, 2007). O contacto das partículas com o ar é determinado de acordo com a posição do pulverizador face à entrada do ar quente. Desta forma existem secadores com fluxo de ar quente em co-corrente ou em contracorrente. No caso em co-corrente, o produto líquido é pulverizado no sentido do fluxo de ar quente (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Em contracorrente, o produto líquido é pulverizado na direção oposta ao fluxo do ar quente (Masters, 1972); e o produto seco é submetido a elevadas temperaturas, o que reduz a sua utilização. Face ao processo em co-corrente é mais económico relativamente ao consumo de energia (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Evaporação da água das partículas

No contacto das gotículas atomizadas do produto com o ar quente de secagem, há transferência de calor no sentido do ar quente para o produto por convecção e o calor é usado para a evaporação da humidade. Por outro lado devido à diferença de temperatura e pressão de vapor, a transferência de água é feita no sentido aposto (Masters, 1972; Gharsallaoui *et al.*, 2007). O ar quente ao entrar em contacto com as partículas leva a um aumento da temperatura do interior das mesmas até um valor constante.

Posteriormente dá-se a evaporação das gotas de água a uma temperatura e a pressão parcial de vapor de água constantes e é formada uma crosta na superfície da partícula. Dá-se por terminado o processo de secagem quando a temperatura das partículas secas é igual à do ar (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Separação do produto seco do ar húmido

Após o processo de secagem, as micropartículas formadas caem na parte inferior da câmara de secagem juntamente com o ar de saída. A separação das partículas secas do ar húmido é feita através de um ciclone ou saco (Murugesan & Orsat, 2012) que se encontra do lado de fora da câmara, o que diminui as perdas de produto para a atmosfera. A maior parte das micropartículas densas são recolhidas na base da câmara de secagem, ao passo que as partículas mais finas passam através do ciclone, onde são separadas do ar húmido (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Vantagens e Desvantagens do processo de *Spray drying*

O *Spray drying* é um processo que aparenta ser eficaz no que diz respeito à produção de micropartículas, o que é explicado pelo fato de esta técnica apresentar inúmeras vantagens. Este método produz partículas de elevada qualidade e de tamanho reduzido e com características físico-químicas específicas, o que é favorável do ponto de vista das propriedades de textura e sensoriais dos produtos finais (Ray *et al.*, 2016).

No entanto algumas condições de funcionamento do *Spray drying* têm implicações/vantagens na produção de partículas e noutros fatores associados, nomeadamente a concentração do caudal de alimentação e a temperatura do ar de entrada (Adaptado de Walton, 2000), tal como podemos observar através da tabela 4.

Tabela 4 – Ação do processo de *Spray drying* na produção das partículas

Aumento da concentração do caudal de alimentação	Aumento da temperatura de secagem
Reduz o tempo de secagem	Reduz o tempo de secagem
Reduz a perda volátil das partículas	Propicia ao aumento ou redução da retenção das partículas voláteis
Diminui a degradação térmica de substâncias sensíveis ao calor	Leva ao aumento da degradação térmica
Aumenta a densidade das partículas	Reduz a densidade da partícula
Leva ao aumento do tamanho da partícula	Aumento do tamanho da partícula

Fonte: Walton, 2000

Por outro lado, este processo permite também reduzir os custos de armazenamento e de transporte e ainda diminuir a percentagem de água no produto final, o que faz com que o mesmo seja estável microbiologicamente, diminuindo desta forma o risco de degradação biológica e química (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Esta técnica de encapsulação é um processo rápido, económico e flexível e funciona de forma contínua, sendo por isso usualmente utilizado no sector alimentar (Ray *et al.*, 2016).

No entanto a secagem por atomização apresenta algumas desvantagens, nomeadamente quando se pretende encapsular probióticos, neste caso há a possibilidade de as bactérias entrarem em contacto com o produto em estudo, quando a hidratação ocorre.

Matrizes de encapsulação

Relativamente ao material de parede, este é utilizado na encapsulação com o intuito de proteger o material do núcleo de diversos fatores que podem promover a degradação do mesmo, diminuir as perdas de voláteis e para impedir a interação entre o composto activo e outros ingredientes (Gharsallaoui *et al.*, 2007). A escolha do tipo de matriz a utilizar é fulcral, visto que influencia a eficácia de encapsulação e a estabilidade das micropartículas que se formam. Por outro lado, estas devem ter ótimas propriedades funcionais, como boa capacidade emulsionante, de gelificação e de formação de filme. Os parâmetros usados na seleção do *wall material*, são principalmente baseados nas características físico-químicas do mesmo, tais como peso molecular, cristalinidade, solubilidade, capacidade de formação de filme, difusibilidade, e de temperatura de transição vítrea (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Tendo em conta o tipo de material a encapsular e as características do produto final, vários tipos de matrizes podem ser utilizadas na encapsulação de compostos alimentares. A selecção do tipo de matriz a utilizar pode ser feita a partir de uma vasta variedade de biopolímeros naturais e sintéticos, tais como gomas (goma arábica, alginatos, carragenatos, entre outros), quitosano, outros hidratos de carbono (amido, maltodextrinas, dextrose, etc) e proteínas (proteínas de soro de leite, caseína, de soja e de trigo) (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2016).

Contudo, os materiais de parede mais utilizados no *Spray drying* são as proteínas do leite, a goma arábica e os hidratos de carbono. Estes, para serem utilizados neste

tipo de encapsulação, devem possuir elevada solubilidade em água, ótimas propriedades de emulsificação e reduzida viscosidade (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Goma arábica

As gomas, designadas frequentemente por colóides hidrofílicos ou hidrocolóides, são polímeros de elevado peso molecular e de cadeia longa que se dissolvem ou se dispersam em água e que possuem propriedades secundárias funcionais como capacidade emulsionante e encapsulante. As gomas são classificadas em seis categorias: extratos de algas marinhas (agar, alginatos, carragenato), exsudatos de plantas (goma arábica, karaya, ghatti e tragacanto), gomas de sementes de plantas (guar), gomas de cereais (amidos), extratos vegetais (pectina, psílio) e em gomas de fermentação (xantano e dextrano).

O termo goma, na indústria, encontra-se associado a polissacáridos e seus derivados ou seja refere-se a compostos naturais provenientes de diversas fontes animais e vegetais (Whistler, 1973).

As gomas são frequentemente utilizadas na encapsulação, no entanto a goma arábica ou goma acácia é mais utilizada pelo facto de possuir ótimas propriedades de emulsificação face aos outros tipos de goma (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A goma arábica é uma goma que provém dos caules ou ramos das árvores de uma planta exsudativa (Ali *et al.*, 2013) e pertence a diversas espécies do género *Acacia*, da subfamília *Mimosoideae* e da família *Leguminosae*. Existem inúmeras espécies do género *Acacia*, que se encontram dispersas nas áreas tropicais e subtropicais, mas apenas algumas são comercializadas (Whistler, 1973).

Este tipo de goma é constituída por uma mistura de sais de cálcio, magnésio e potássio de ácido arábico, i.e, uma mistura composta de “*polissacáridos ramificados constituídos por arabinose, galactose, ácido glucurónico e por açúcares de ramnose*” (Techomic, 1995) e de aproximadamente 2% de proteínas. A presença desta fração proteica na goma arábica confere à mesma boas propriedades de emulsificação num sistema óleo em água (O/W) (Fernandes *et al.*, 2014).

Este material de parede é inodoro e incolor, não tem gosto, não é tóxico e não altera a cor, sabor e odor do alimento em que é adicionado. Em termos de solubilidade, é insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos e em óleos e sóluvel

em etanol e muito solúvel em água quente e fria. Apesar deste tipo de goma ser solúvel em água, as partículas coloidais tendem a aglomerar-se e, por outro lado, quando a goma se encontra dispersa na água, as partículas têm dificuldade em dissolverem-se (Whistler, 1973).

A goma arábica é muito utilizada em diferentes áreas, tendo desta forma várias aplicações, no setor alimentar, em medicina, na produção de produtos farmacêuticos, cosméticos, têxteis e tintas e em litografia (Whistler, 1973). No entanto, a principal utilização deste tipo de matriz é na área alimentar, onde é usada como estabilizante e espessante na produção de coberturas, produtos de confeitaria e de cerveja (Techomic, 1995). É usada na encapsulação de lípidos, mas também é utilizada para encapsular aromas e *flavours* (Gharsallaoui *et al.*, 2007). A sua utilização deve-se ao facto deste polissárido ter a capacidade de formar emulsões e filmes, por ser um bom emulsionante e pelas suas propriedades de encapsulação (Ali *et al.*, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A utilização desta goma permite melhorar a estabilidade das dispersões formadas através de emulsões e desta forma aumentar a eficácia de encapsulação. Apesar de a goma arábica ser considerada uma óptima matriz de encapsulação, a sua utilização acarreta problemas, visto que é muito dispendiosa e a sua oferta é limitada, o que leva à procura de outras matrizes de encapsulação como alternativa à sua utilização (Estevinho *et al.*, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Preparação da alimentação em forma de emulsão

Uma emulsão, consiste numa dispersão constituída por dois líquidos imiscíveis geralmente óleo e água, onde um deles se encontra disperso (fase dispersa) no outro (fase contínua) sobre a forma de gotas. As emulsões alimentares são normalmente classificadas em dois tipos, cuja classificação é feita com base na distribuição das duas fases (óleo e água). Quando as gotas de óleo estão dispersas em água designa-se por emulsão óleo em água (O/W), enquanto se acontecer o contrário estamos perante uma emulsão água em óleo (W/O) (Hosseini *et al.*, 2015).

As emulsões caracterizam-se por serem termodinamente instáveis. A estabilização das emulsões pode ser feita através da adição de surfactantes, polissacáridos, fosfolípidos ou de proteínas (Liu *et al.*, 2016). Os surfactantes são agentes de estabilização devido às suas propriedades anfifílicas. Estas características favorecem a redução da tensão superficial da fase contínua e à desagregação das gotas na fase dispersa.

Diversos hidrocolóides podem ser usados como estabilizantes de emulsões, no entanto só alguns é que atuam como emulsionantes, tais como os biopolímeros – a goma arábica, pectina, caseinato de sódio, proteína de soro do leite isolada, entre outros. A goma arábica, tal como foi referido, é um agente emulsificante muito utilizado visto que mantém as suas funções sob diferentes condições (Hosseini *et al.*, 2015).

Caracterização e aplicações das micropartículas obtidas por *Spray drying*

Caracterização das micropartículas

A encapsulação, tal como foi dito anteriormente, é um processo que permite produzir partículas que podem ser categorizadas conforme o seu tamanho e com a distribuição do composto biativo. No que diz respeito ao tamanho as partículas podem ser classificadas em nanopartículas, micropartículas e macrocápsulas (Ray, Raychaudhuri & Chakraborty, 2016).

No caso das micropartículas, estas são pequenas partículas esféricas com diâmetros compreendidos entre 1 μm a 1000 μm (Campos *et al.*, 2013). De acordo com a uniformidade de partícula, qualidade, esfericidade e distribuição de tamanho e do composto ativo podem existir diferentes tipos de micropartículas (Sahil *et al.*, 2011). Desta forma, consoante a distribuição do composto ativo podem-se classificar em matriz, reservatório e matriz revestida (Ray *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2013) (figura 10):

- **Reservatório**, as micropartículas apresentam um núcleo, que se encontra na região central, rodeado por um filme definido e contínuo – material de parede (microcápsulas);
- **Matriz**, as micropartículas encontram-se dispostas numa mistura homogénea, onde o composto bioativo encontra-se disperso sobre o material de parede (microesferas);
- **Matriz revestida** é a combinação do tipo reservatório e o tipo matriz, onde o agente ativo encontra-se coberto por uma camada adicional para além da cápsula.

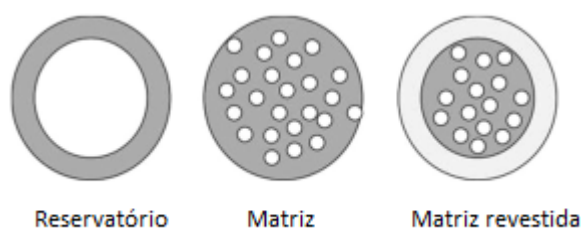


Figura 10 – Tipos de micropartículas de acordo com a distribuição do composto ativo

Fonte: Ray, Raychaudhuri & Chakraborty, 2016

Por outro lado, conforme a constituição do material de parede, as características físico-químicas do composto bioativo e o tipo de encapsulação utilizado, obtém-se vários tipos de micropartículas como (Gharsallaoui *et al.*, 2007) (figura 11):

- Uma esfera simples rodeada por um invólucro de espessura uniforme;
- Conjunto de partículas com forma irregular;
- Diversas substâncias ativas no interior de uma cápsula;
- Diversas substâncias ativas envolvidas numa matriz contínua de material de revestimento;
- Multicamadas de micropartículas.



Figura 11 – Morfologia dos diferentes tipos de micropartículas

Fonte: Gharsallaoui *et al.*, 2007

As micropartículas podem ser obtidas a partir de diferentes materiais, naturais ou sintéticos e através de diversas técnicas de encapsulação, havendo desta forma uma diversificação de micropartículas de acordo com o seu tamanho, composição e morfologia (Sahil *et al.*, 2011).

As micropartículas produzidas pelo método de encapsulação *Spray drying* são geralmente pequenas esferas uniformes constituídas por uma só camada de material, uma película/revestimento que envolve o material interno (substância activa – *core material*). Estas permitem proteger/isolar a substância activa de qualquer tipo de exposição a fatores externos que possam degradar/afetar a substância (Rocha *et al.*, 2012). O material do núcleo, tal como referido anteriormente, pode ser uma emulsão, um material cristalino, uma partícula absorvente irregular, uma suspensão de microcápsulas pequenas ou então uma suspensão de sólidos (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

As micropartículas obtidas pelo *Spray drying* podem ser analisadas a partir de uma imagem digital com base no auxílio de diversas técnicas tais como microscópico de electrónico varrimento (*Scanning Electron Microscopy* – SEM), microscopia de luz convencional e microscopia confocal. A microscopia de luz convencional é uma técnica simples utilizada para avaliar as modificações morfológicas causadas pelas condições de secagem. O SEM é uma técnica muito utilizada e permite observar as amostras com uma maior resolução das imagens face à microscopia convencional (Sahil *et al.*, 2011; Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005).

A partir da técnica SEM é possível classificar as partículas obtidas em três categorias diferentes, que dependem do tipo de secagem, mais concretamente das condições de alimentação como da concentração e temperatura, bem como da temperatura do ar e das condições de atomização (Walton, 2000):

- **Partículas cristalinas:** *“Partículas formadas por grandes núcleos de cristais individuais ligados entre si de forma contínua microcristalina”*
- **Partículas do tipo aglomerado:** *“Partículas com menos de 1 μm de diâmetro constituídas por grãos individuais ligados através de poeiras”*
- **Partículas do tipo *skin forming*:** *“Partículas constituídas por uma fase não líquida contínua de natureza polimérica”.*

Aplicações das micropartículas

Hoje as micropartículas, têm diversas aplicações, sendo por isso utilizadas na produção de diversos produtos e em inúmeras áreas, como por exemplo na produção de tintas, adesivos, revestimentos, cosméticos, materiais de construção, em biotecnologia, medicina e na área alimentar na produção de produtos alimentares (Campos *et al.*, 2013; Zuidam & Nedović, 2010).

A aplicação das micropartículas em produtos alimentares, tem sido pouco estudada, no entanto a sua utilização tem sido feita com o intuito de proteger/estabilizar os compostos ativos encapsulados (Zuidam & Nedović, 2010). O seu uso permite modificar o sabor, a solubilidade e a cor dos alimentos. Por outro lado a sua utilização torna-se benéfica, uma vez que fornece muitos antioxidantes, actua como agente antimicrobiano e como suplemento alimentar (Rutz *et al.*, 2016).

Porém a sua utilização acarreta alguns desvantagens/limitações, por exemplo pode proporcionar uma má textura em alguns produtos alimentares, levar ao aumento dos custos para o fabricante, exigir que os funcionários tenham formação sobre a segurança/manuseio dos equipamentos, o aprovisionamento do produto final poderá necessitar de novas condições de embalagem e pode alterar a estabilidade do produto encapsulado no decorrer do processamento (Campos *et al.*, 2013).

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção do extrato de repiso de tomate

3.1.1. Estabilização do repiso de tomate

O repiso de tomate, fornecido pelo Grupo Hlt – Holding da Indústria Transformadora de Tomate – Italagro e Fit, foi recebido congelado, sendo depois liofilizado e triturado. De seguida, as partículas secas (de agora em diante designadas por repiso em pó) foram separadas num sistema de crivos dispostos em coluna, através de malhas com diâmetros progressivamente menores (1 e 0,5 mm), com o intuito de separar as partículas com diâmetro menor que 0,5 mm.

3.1.2. Caracterização do repiso de tomate em pó

Depois de se obter o repiso de tomate em pó, determinou-se a sua atividade antioxidante e quantificou-se os carotenóides presentes no mesmo.

3.1.2.1. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do repiso de tomate em pó foi determinada através de três métodos: DPPH, FRAP e ABTS.

Método DPPH

Primeiramente foi preparada a solução de DPPH *stock*, onde foram dissolvidos 24 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma Aldrich) em 50 mL de etanol (Sigma Aldrich). Posteriormente homogeneizou-se a solução, colocou-se folha alumínio à volta do balão e armazenou-se a mesma durante 2h num local escuro (Adaptado de Rufino *et al.*, 2007a). Após esse período foi preparada a solução de trabalho de DPPH através da diluição da solução de DPPH *stock* com etanol e foi lida a sua absorvância num espectrofotómetro (UNICAM, UV/Vis Spectrometer–UV4, Portugal) a um comprimento de onda de 515 nm. Esta diluição foi realizada com o intuito de verificar se a solução preparada estava pronta a ser utilizada, até atingir uma absorvância inferior a 1.1.

De forma a avaliar a capacidade antioxidante das amostras, adicionou-se 5 mg e 10 mg de repiso em pó (em paralelo), a 3,9 mL de solução de trabalho de DPPH e 0,1 mL de etanol em tubos de ensaio. Ao mesmo tempo preparou-se a solução referência – o branco (radical) com 0,1 mL de etanol e 3,9 mL de DPPH. Posteriormente agitaram-se as misturas num vortex e deixou-se reagir no escuro durante 40 minutos. Após esse tempo, os sólidos em suspensão foram separados por centrifugação numa microcentrífuga (Thermo Fisher Scientific, Shanghai) a 7000 rpm durante 7 min, e mediu-se a absorvância das amostras e do branco através do espectrofotómetro a um comprimento de onda de 515 nm. De forma a proceder à leitura da absorvância das amostras (matriz + radical) calibrou-se o aparelho com etanol. As análises foram realizadas em triplicado (Adaptado de Rufino *et al.*, 2007a).

A partir dos valores de absorvância obtidos foi calculado o RSA (*Radical Scavenging Activity*) expresso em percentagem, através da equação 1:

$$RSA (\%) = \frac{Abs_{radical} - Abs_{matriz+radical}}{Abs_{radical}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Os resultados da atividade antioxidante referente às amostras foram expressos em valores de TEAC (Equação 2), que corresponde à capacidade antioxidante de um composto, em termos de mmol de Trolox/ g da amostra (Adaptado de Gan *et al.*, 2010)

$$TEAC = \frac{mmol\ de\ Trolox}{g\ de\ amostra} \quad (\text{Equação 2})$$

Curva de calibração com o Trolox para o método DPPH

De forma a converter o valor de RSA das amostras em trolox foi elaborada uma curva de calibração utilizando o reagente Trolox (Acros organics) como padrão (Adaptado de Rufino *et al.*, 2007b). Apresentado-se no Anexo I a respectiva curva. Para a elaboração desta, foram preparadas diferentes soluções de Trolox em etanol com concentrações entre 250 µM a 2000 µM, de forma a reagir com o DPPH, utilizando o procedimento acima mencionado para as amostras (Adaptado de Rufino *et al.*, 2007a).

Método FRAP

Com o objetivo de se proceder à avaliação da atividade antioxidante do repiso de tomate em pó por este método foi necessário a preparação do reagente FRAP. Reagente esse obtido a partir da mistura de três soluções previamente preparadas: solução de tampão acetato (Sigma Aldrich) 0,3 M com pH 3,6; solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (Sigma Aldrich) 10 mM; e solução aquosa de cloreto férrico (Pancreae) 20 mM (Adaptado de Rufino et al., 2007c).

Depois de preparado o reagente FRAP, colocou-se num tubo de ensaio 2 mg de repiso em pó, 2,7 mL de reagente FRAP, 0,27 mL de água e 0,09 mL de água destilada. Em paralelo, preparou-se também o branco, em tubos de ensaio nos quais se adicionaram 2,7 mL de FRAP, 0,27 mL de água destilada e 0,09 mL de etanol. Depois os tubos foram agitados e colocados durante trinta minutos em banho-maria a 37 °C com agitação e cobertos com folha de alumínio. Posteriormente, os sólidos em suspensão foram separados por centrifugação numa microcentrífuga (Thermo Fisher Scientific, Shanghai) a 7.000 rpm durante 7 min, e foi medida a absorvância das soluções preparadas num espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm. O procedimento foi realizado em triplicado. Para calibrar o aparelho foi utilizada água destilada (Adaptado de Rufino et al., 2007c).

A atividade antioxidante das amostras foi expressa através do TEAC (Equação 2).

Curva de calibração com o Trolox para o método FRAP

Para a obtenção da curva de calibração do FRAP, que se encontra no Anexo I, também se utilizou o reagente Trolox como padrão tal como no caso do DPPH. Desta forma, para obter a curva, prepararam-se diferentes soluções padrão de trolox e de etanol com concentrações de 250 µM a 1000 µM com o objetivo de reagir com o FRAP, usando as mesmas condições das amostras (Adaptado de Rufino et al., 2007c).

Método ABTS

De forma a proceder à determinação da atividade antioxidante do repiso em pó, preparou-se inicialmente a solução *stock* de ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) (Sigma Aldrich) a partir da reação de ABTS com a

solução de persulfato de potássio (Pancreae) 140 mM. De seguida, após o tempo de reação de 16 horas no escuro à temperatura ambiente a solução *stock* foi diluída em etanol, até que a mesma tivesse uma absorvância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

Posteriormente em ambiente escuro, misturou-se 2,5 mg e 5 mg de repiso em pó (em paralelo), com 3 mL de solução de trabalho de ABTS e 30 μ L de etanol em tubos de ensaio. Ao mesmo tempo preparou-se a solução referência através de 3 mL de ABTS com 30 μ L de etanol. De seguida homogeneizaram-se os tubos de ensaio. Após seis minutos de reação, os sólidos em suspensão foram separados por centrifugação numa microcentrífuga (Thermo Fisher Scientific, Shanghai) a 7.000 rpm durante 7 min, e procedeu-se à leitura da absorvância das amostras e do branco num espectrofotómetro (UNICAM, UV/Vis Spectrometer–UV4, Portugal) a um comprimento de onda de 734 nm. As análises foram feitas em triplicado e calibrou-se o equipamento com etanol (Adaptado de Rufino *et al.*, 2007b) .

Com base nos valores de absorvância obtidos, calculou-se o RSA (*Radical Scavenging Activity*) expresso em percentagem através da equação 1 e a atividade antioxidante das amostras foi expressa através do TEAC (Equação 2).

Curva de calibração com o Trolox para o método ABTS

Com o intuito de se obter a curva de calibração do ABTS, que se encontra no Anexo I, também se utilizou o reagente Trolox (Acros organics) como padrão tal como no caso do DPPH e FRAP. Assim, prepararam-se as soluções de trolox em etanol com concentrações finais entre 250 a 2000 μ M nas mesmas condições acima descritas de forma a reagir com o ABTS.

3.1.3. Processo de extração dos compostos bioativos do repiso de tomate em pó

O repiso de tomate em pó foi extraído com o método de extração sólido-líquido em *Soxhlet* (Adaptado de Vági *et al.*, 2007), usando etanol como solvente, obtendo-se assim o extrato etanólico. Usou-se um volume de 300 mL de etanol para 15 g de repiso em pó; sendo que o processo foi conduzido até que o etanol proveniente do cartuxo não apresentasse coloração.

Terminada a extração, a massa de extrato obtida foi quantificada, centrifugada, de modo a separar o sobrenadante das partículas suspensas (pó); e posteriormente o

sobrenadante foi concentrado. Assim, colocaram-se 35 mL de extrato etanólico em tubos *Falcon* e procedeu-se à centrifugação do extrato durante 10 minutos a uma velocidade de 5000 rpm e à temperatura 8 °C, através da centrífuga (HERMLE Labortechnik Z383K). Depois de terminada a centrifugação, concentrou-se o extrato através do Rotavapor R II BUCHI, com o intuito de evaporar o etanol e obter-se o extrato de repiso de tomate concentrado (ERTC). Extrato esse que após ser obtido foi colocado em frascos âmbar e armazenado no congelador a -20 °C.

3.2. Caracterização do extrato de repiso de tomate concentrado

Para a determinação da atividade antioxidante; e para a quantificação dos carotenóides foi efetuada inicialmente uma diluição do ERTC. Como tal, transferiu-se uma certa quantidade de ERTC, entre 0,1 a 0,4 g, para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume do mesmo com etanol.

3.2.1. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do ERTC diluído foi determinada recorrendo a três métodos distintos, DPPH, FRAP e ABTS.

A determinação da atividade antioxidante das amostras e da curva de calibração nos três métodos foi igual, tal como no caso da determinação da atividade antioxidante do repiso em pó, no entanto as condições da amostra a analisar foram diferentes. Desta forma no caso do método DPPH, utilizou-se 3,9 mL de solução de trabalho padrão de DPPH e 0,1 mL de extrato diluído preparado anteriormente. No FRAP, usou-se 2,7 mL de reagente FRAP, 0,27 mL de água destilada e 0,09 mL do extrato diluído do repiso de tomate. E por último no ABTS utilizou-se 3 mL de solução de trabalho de ABTS e 30 µL de extrato diluído preparado anteriormente em tubos de ensaio.

3.2.2. Determinação dos carotenóides

Para a determinação dos carotenóides, presentes no ERTC diluído, recorreu-se ao método de cromatografia líquida através de um sistema de HPLC Ultimate-3000 (Dionex) com uma coluna C18 com 5 µm, 120 Å (4.6x150 mm) (Køcks *et al.*, 2013).

Inicialmente procedeu-se à preparação da amostra a analisar e dos solventes (eluentes) a utilizar na coluna e de seguida determinou-se os carotenóides presentes

na amostra. Assim, o ERTC diluído em etanol (referido no ponto 3.2.1) foi filtrado com uma seringa com um filtro *NYL* com diâmetro de poro de 0,45 μm . Por fim, foram preparados filtrados e desgaseificados, através de ultra-sons, os solventes A³ e B⁴. Utilizou-se um caudal total de eluentes de 1 mL/min com 25% de A e 25% de B à temperatura de 25 °C. Injetou-se 20 μL de ERTC diluído.

As curvas de calibração do licopeno e do β -caroteno, que se encontram no Anexo II, foram quantificadas por injeção de 20 μL das soluções padrão de licopeno e de β -caroteno respetivamente, e ambas as soluções foram inicialmente diluídas em acetonitrilo e diclorometano.

A determinação dos carotenóides presentes no ERTC diluído em etanol foi realizada através de um detetor de díodos *DAD-3000* a 475 e 472 nm para licopeno e 440 nm para o β -caroteno (Adaptado de Kœcks *et al.*, 2013).

3.3. Encapsulação de β -caroteno com goma arábica por *Spray drying*

Antes de proceder à encapsulação do ERTC com a goma arábica por *Spray drying* foram realizados ensaios com um carotenóide modelo, o β -caroteno, usando a metodologia de superfície de resposta (RSM). Ensaios esses efetuados de forma a escolher as melhores condições para posteriormente realizar a encapsulação com o ERTC.

Foi aplicado um delineamento experimental rotacional composto com duas variáveis independentes (concentração de goma arábica e temperatura do ar de entrada) a cinco níveis. Foi usada uma concentração de goma arábica entre 5 e 35% e uma temperatura do ar de entrada entre 110 e 200 °C. No delineamento representado pela tabela 5, a variável x1 representa a concentração de goma arábica e a variável x2 a temperatura do ar de entrada. O ponto central foi realizado em triplicado.

³Solvente A – Acetonitrilo: Água: Tetraetilamónio preparado na proporção de 900:100:1

⁴Solvente B – Preparado somente com acetato de etilo (100%)


Tabela 5 – Delineamento experimental rotacional composto para o estudo da encapsulação de β -caroteno com goma arábica por *Spray drying*


Amostra	x1	x2		%GA	T°C
1	-1	-1	<i>Desenho fatorial</i>	9,4	123,2
2	-1	1		9,4	186,8
3	1	-1		30,6	123,2
4	1	1		30,6	186,8
5	0	0	<i>Ponto central</i>	20	155
6	0	0		20	155
7	0	0		20	155
8	$-\alpha$	0	<i>Pontos axiais</i>	5	155
9	$+\alpha$	0		35	155
10	0	$-\alpha$		20	110
11	0	$+\alpha$		20	200


Tratamento estatístico

O delineamento experimental rotacional composto utilizado foi efetuado com recurso ao software de estatística Statistica e permitiu obter um modelo matemático. Modelo esse que foi definido através de uma equação de segundo grau ajustada que correlaciona a variável dependente (y) em função das variáveis independentes (x_T , x_T^2 , x_{GA} , x_{GA}^2 , x_{GAT}) (Equação 4).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_{GA} + \beta_2 x_{GA}^2 + \beta_3 x_T + \beta_4 x_T^2 + \beta_5 x_{GAT} + \varepsilon_0 \quad (\text{Equação 4})$$


 Efeito linear


 Efeito quadrático


 Efeito de interação

Com base numa ANOVA analisou-se os efeitos das variáveis independentes e das interações entre elas nas variáveis dependentes, em função do valor do p-value para um intervalo de confiança de 95%.

3.3.1. Preparação das emulsões

Foram preparadas as soluções de alimentação, sob a forma de emulsão, para as onze experiências indicadas na tabela 5. Desta forma para cada uma, inicialmente a goma arábica (GA) (Labchem) foi dissolvida em água destilada sob agitação durante a noite. Após esse tempo de agitação, o β -caroteno foi adicionado à mistura e de seguida a mesma foi homogeneizada através do Ultra-Turrax T25 (IKA, Alemanha) durante 30 segundos a 13500 min^{-1} de forma a formar uma emulsão, tendo cada uma delas uma massa total de 25 g e 5% de β -caroteno (massa de β -caroteno/massa de goma arábica).

3.3.2. Processo de encapsulação por *Spray drying*

Após preparadas as emulsões equivalentes a cada amostra, foi realizado a encapsulação num *Spray dryer* (Lab-Plant SD-05, Huddersfield) operando em corrente, equipado com um *nozzle* de 0,5 mm de diâmetro.

No decorrer do processo, a emulsão foi agitada com um agitador magnético. O caudal de entrada de alimentação foi de 3,3 mL/min e as emulsões preparadas anteriormente foram submetidas às condições de secagem que se encontram na tabela 5. Depois de terminada a secagem, as micropartículas obtidas foram recolhidas em frascos de vidro âmbar, pesadas e armazenadas em condições refrigeradas (4-9°C).

O rendimento de secagem em percentagem (%RS), das micropartículas obtidas por *Spray drying*, foi calculado através da equação 5, descrita por Battista *et al.* (2015) com algumas alterações.

$$\%RS = \frac{\text{Massa de micropartículas obtidas pelo Spray drying}}{\text{Massa total de sólidos adicionados no caudal de alimentação}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

3.3.3. Caracterização das micropartículas

3.3.3.1. Morfologia

Analizou-se a morfologia das micropartículas através por microscopia eletrónica de varrimento, usando um microscópio electrónico (Hitachi S2400, Alemanha). As

amostras foram revestidas com uma camada de material condutor de ouro e paládio (80% de ouro e 20% de paládio) e foi usado um feixe de electrões de 15 kV.

Através das imagens recolhidas mediu-se a distribuição de tamanho das partículas de cada amostra.

3.3.3.2. Carregamento das partículas em β -caroteno

Fez-se contactar 10 mg de micropartículas com 50 mL de etanol agitando usando um homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA, Alemanha) durante três minutos a 13500 min⁻¹ dando origem a um extrato. Esse extrato foi posteriormente colocado em frascos âmbar e armazenado numa câmara frigorífica a 4-9 °C.

Após 24h de estabilização na câmara, o extrato foi centrifugado (durante 10 minutos, 10.000 r.p.m, 8 °C) de forma a separar o sobrenadante (extrato) de um precipitado branco formado; e acondicionado em frascos âmbar na câmara frigorífica a 4-9 °C.

Posteriormente, foi efectuada a quantificação do β -caroteno no extrato, por espectrofotometria a 450 nm. Efetuou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de β -caroteno (0,5 a 10 mg/L) que se encontra no Anexo III.

O carregamento das micropartículas em β -caroteno (grau de encapsulação) foi expresso em massa de β -caroteno por unidade de massa de partículas.

A eficiência de encapsulação em percentagem (%EE), foi calculada com base no grau de encapsulação através da equação 6.

$$\% EE = \frac{\text{Massa de composto biativo encapsulado}}{\text{Massa de composto biativo adicionado na emulsão}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

3.3.3.3. Atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado

Relativamente à atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado, esta foi medida usando o extrato referido na secção anterior, depois de uma etapa de concentração de modo a ser possível usar o método ABTS.

Assim após obtido o extrato concentrado, foi determinado a atividade antioxidante nas mesmas condições que no caso da farinha, excepto a quantidade de ABTS, de amostra e de branco a analisar. Desta forma, foram utilizados no caso da amostra 0,8

mL de extrato de microcápsulas e 2,2 mL de ABTS (Sigma Aldrich); e relativamente à amostra referência – branco foram utilizados 0,8 mL de etanol e 2,2 mL de ABTS.

Em paralelo, foi realizada uma caracterização do β -caroteno puro em termos da sua atividade antioxidante, com o intuito de se comparar os valores das capacidades antioxidantes deste carotenóide antes e depois de ser encapsulado com GA. Assim, determinou-se a atividade antioxidante a partir do método ABTS da mesma forma que no caso da farinha de repiso de tomate, no entanto as condições da amostra a analisar não foram as mesmas. Neste caso usaram-se 2,2 mL de ABTS e 800 μ L de solução de β -caroteno diluída em etanol (de concentração 5 mg/L).

A partir dos valores de absorvância obtidos calculou-se o RSA (*Radical Scavenging Activity*) expresso em percentagem através da equação 1 e a atividade antioxidante das amostras foi expressa através do TEAC (μ mol de Trolox/ g de amostra).

3.4. Encapsulação do extrato de repiso do tomate concentrado com GA

Após a caracterização das micropartículas de β -caroteno com goma arábica escolheram-se as condições para se efetuar o encapsulamento do ERTC com base nos resultados do grau de encapsulação do β -caroteno. Desta forma foram escolhidas as condições que se encontram na tabela 6.

Tabela 6 – Condições para o encapsulação de repiso de tomate concentrado com goma arábica

Amostra	Condições	
	%GA	Temperatura (°C)
1	35	200
2		110

3.4.1. Preparação das emulsões

Cada emulsão, associada a cada amostra, foi preparada com 50 g de solução (água destilada e goma arábica) e com 15% de ERTC através do Ultra-Turrax T25 (IKA, Alemanha) durante três minutos a 13500 min⁻¹.

3.4.2. Processo de encapsulação através do *Spray drying*

O procedimento realizado e as condições utilizadas relativas ao caudal de alimentação no processo de encapsulação através do *Spray drying* foram as mesmas condições que no caso da encapsulação do β -caroteno com GA no entanto as condições de secagem utilizadas foram as que se encontram na tabela 6.

O rendimento de secagem das micropartículas de goma arábica com ERTC obtidas foi calculado através da equação 5.

3.4.3. Caracterização das micropartículas

3.4.3.1. Morfologia

A morfologia das micropartículas de ERTC com GA foi realizada da mesma forma que no caso das micropartículas de β -caroteno e goma arábica.

3.4.3.2. Carregamento das partículas em ERTC

Após ter sido realizado a encapsulação para cada amostra procedeu-se à extração do extrato encapsulado presente nas micropartículas através do Ultra-Turrax T25 (IKA, Alemanha) durante 3 minutos a 13500 min^{-1} de acordo com as condições indicadas na tabela 7.

Tabela 7 – Condições de extração associadas a cada temperatura

Temperatura	Condições	
	Quantidade de micropartículas (mg)	Volume de etanol (mL)
200 °C	50	50
	150	
	200	
110 °C	50	
	150	

Depois das micropartículas terem sido extraídas, procedeu-se da mesma forma que no caso das micropartículas de β -caroteno, ou seja o extrato foi armazenado, centrifugado e concentrado. No entanto antes do extrato, associado a cada amostra, ser concentrado o mesmo foi filtrado com o auxílio de uma seringa com o filtro *NYL* de 0,45 μm , uma vez que após a centrifugação haviam partículas em suspensão.

Posteriormente, foi efectuada a quantificação dos carotenóides presentes no extrato, a partir do HPLC Ultimate-3000 (Dionex) com uma coluna C18 com 5 μm , 120 A° (4.6x150 mm) (Køcks *et al.*, 2013). Os solventes utilizados foram os mesmos que se encontram referidos no ponto 3.2.2 e o padrão usado nas curvas de calibração, que se encontram no Anexo II, foram o licopeno e o β -caroteno. A deteção dos carotenóides foi realizada com um detetor de díodos DAD-3000 a 440 nm para o β -caroteno e 475 e 472 nm para o licopeno.

O carregamento das micropartículas em ERTC (grau de encapsulação) foi expresso em massa de licopeno/ β -caroteno por unidade de massa de partículas.

Após a determinação dos carotenóides, calculou-se a eficiência de encapsulação através da equação 6.

3.4.3.3. Determinação da atividade antioxidante do ERTC encapsulado

A atividade antioxidante das micropartículas foi determinada através dos métodos DPPH, FRAP e ABTS. As condições utilizadas nos três métodos foram as mesmas que no caso da farinha, tirando a quantidade de radical, amostra e de branco a analisar. No DPPH usou-se no caso da amostra 1 mL de extrato de micropartículas e 3 mL de DPPH (Sigma Aldrich) e relativamente ao branco foram utilizados 1 mL de etanol (Sigma Aldrich) e 3 mL de DPPH. No FRAP utilizaram-se no que diz respeito à amostra 630 μL de extrato, 2,16 mL de FRAP (Sigma Aldrich) e 270 μL de água; e no branco 630 μL de água, 2,16 mL de FRAP e 270 μL de água. No caso do método ABTS, relativamente à determinação da atividade antioxidante do extrato de micropartículas, foram utilizados 800 μL de extrato e 2,2 mL de ABTS (Sigma Aldrich) e para o branco, amostra referência, 800 μL de etanol e 2,2 mL de ABTS.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização do repiso de tomate em pó e do seu extrato

Neste estudo, tal como foi referido anteriormente, foi realizada uma caracterização do repiso de tomate em pó e do extrato etanólico do mesmo (ERTC). Os resultados das análises referentes à atividade antioxidante do repiso de tomate em pó e do ERTC, bem como a quantidade de carotenóides, encontram-se descritos na tabela 8.

A extração do repiso de tomate foi feita a partir do *Soxhlet* com etanol e a concentração do extrato etanólico foi realizada através do Rotavapor.

Tabela 8 – Resultados das análises realizadas ao repiso em pó e ao extrato de repiso de tomate concentrado

Matérias-primas	Métodos	Resultados	
Repiso de tomate em pó	Atividade antioxidante DPPH FRAP ABTS	TEAC (mmol de trolox/ g de repiso em pó)	
		0,01	
		0,04	
		0,011	
	Carotenóides	mg de licopeno/g de repiso em pó	mg de β -caroteno/ g de repiso em pó
		0,05	0,04
ERTC	Atividade antioxidante DPPH FRAP ABTS	TEAC (mmol de trolox/ g de repiso em pó)	TEAC (mmol de trolox/ g de extrato)
		62	176
		135	382
		111	314
	Carotenóides	mg de licopeno/ g de extrato	mg de β -caroteno/ g de extrato
		0,14	0,11

Através da análise da tabela 8, verifica-se que o ERTC apresenta uma atividade antioxidante, quantificada pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS, muito superior em valores de TEAC (mmol de trolox/ g de repiso em pó) em comparação com o repiso em pó. O repiso em pó ao ser extraído com etanol, permite que a quantidade dos compostos bioativos se torne mais disponível para reagir com o antioxidante (Azmir *et al.*, 2013), o que faz com que a capacidade antioxidante do ERTC aumente. Por outro lado, também se verifica os valores de atividade antioxidante são distintos nos três

métodos (DPPH, FRAP e ABTS), o que é de esperar visto que o mecanismo de ação nos três métodos é diferente (Musa *et al.*, 2013).

Relativamente aos carotenóides presentes no ERTC e no repiso em pó, verifica-se que a quantidade de licopeno e de β -caroteno obtida não foi a esperada, uma vez que a quantidade de ambos é próxima. A quantidade de licopeno deveria ser maior face ao β -caroteno (Kalogeropoulos *et al.*, 2012). Desta forma, as condições de extração deveriam ser optimizadas, utilizando por exemplo um solvente de extração mais eficiente como o clorofórmio ou o diclorometano.

Comparando, os valores obtidos do ERTC, referentes aos carotenóides face à literatura que se encontra na tabela 9, apesar de as condições de estudo não serem as mesmas, não é possível fazer uma comparação direta, no entanto verifica-se que a quantidade de carotenóides em termos de licopeno e β -caroteno, é superior ao estudo realizado.

Tabela 9 – Resultados de análises realizadas ao extrato de repiso de tomate seco segundo a literatura

Autor do artigo	Matéria-prima	Resultados
Vági <i>et al.</i> , (2007)	<u>Extrato de repiso de tomate seco (sementes e cascas de tomate amadurecido)</u> obtido pelo método <i>Soxhlet</i> com 96% de etanol. Diâmetro de partícula da amostra: entre 0,3 (1) e 0,6 mm (2)	<u>Carotenóides</u> Licopeno: (1) 0,077 mg/g de extrato; (2) 0,703 mg/ g de extrato β-caroteno: (2) 0,034 mg/ g de extrato

4.2. Encapsulação de β -caroteno com goma arábica através do processo de *Spray drying*

4.2.1. Processo de encapsulação por *Spray drying*

Tal como foi referido neste trabalho, após a realização da secagem, foi calculado rendimento de secagem em percentagem (%RS) das micropartículas de β -caroteno com GA. Na tabela 10 encontram-se os resultados do %RS obtidos associados a cada amostra do desenho experimental.

Tabela 10 – Rendimento de secagem e quantidade de micropartículas associado a cada desenho experimental

Amostra	%GA	T °C	Micropartículas recolhidas (g)	%RS
1	9,4	123,2	0,528	21
2	9,4	186,8	0,631	26
3	30,6	123,2	1,250	16
4	30,6	186,8	1,215	15
5	20	155	2,197	42
6	20	155	1,426	27
7	20	155	2,064	39
8	5	155	0,297	23
9	35	155	2,030	22
10	20	110	1,429	27
11	20	200	1,714	33

Analisando a tabela 10, verifica-se que quando a temperatura aumenta mantendo a mesma %GA o valor de %RS aumenta (Exemplos: amostras 1-2 e 10-11). Por outro lado o mesmo também se verifica quando a %GA aumenta mantendo a mesma temperatura (amostra 7-8). No entanto, quando a %GA aumenta de 20% para 35% o %RS diminui.

Por sua vez através da análise da tabela constata-se que todas as amostras apresentam valores de %RS menores que 42%. Segundo o estudo realizado por Nunes & Mercadante (2007), que teve como objetivo o encapsulamento de cristais de licopeno (obtidos de tomates frescos) com GA e sacarose por *Spray drying*⁵, o valor obtido de %RS foi de $51 \pm 1\%$. Tendo em conta que o estudo referido anteriormente não apresenta exatamente as mesmas condições, visto que utiliza um material de parede e um composto bioativo diferente, não é possível fazer uma comparação direta, no entanto verifica-se que o rendimento de secagem obtido pelo presente estudo é baixo (<51). O reduzido valor de rendimento pode estar associado com a deposição da emulsão, que não é atomizada, nas paredes da câmara de secagem (Johansen, *et al.*, 2000); e com a condensação da água no interior da câmara, o que possibilita a adesão

⁵ **Condições de secagem segundo o realizado por Nunes & Mercadante (2007):** Caudal de alimentação: 30 mL/min; Temperatura do ar de entrada e de saída: 170 ± 2 e 113 ± 2 °C; Pressão do ar: 5 kgf/cm²; Diâmetro de noozle de 0,7 mm.

das partículas às paredes da mesma, ao invés de serem recolhidas no ciclone (Prinn *et al.*, 2002). O que faz com que a quantidade de micropartículas recolhidas diminua e por sua vez a %RS também, tal como se pode observar, como por exemplo, no caso da amostra 1 em comparação à amostra 2.

O valor do rendimento de secagem depende das configurações do equipamento, do tipo e da concentração do material da parede usado, bem como das condições de secagem (caudal, temperatura da alimentação e da temperatura do ar entrada) (Nunes & Mercadante, 2007; Rutz *et al.*, 2016). Desta forma, devido a estes fatores, este parâmetro não é muito citado na literatura. Assim, não é possível comparar o rendimento de encapsulamento das micropartículas de β -caroteno com goma arábica baseada na literatura, com condições semelhantes, uma vez que a maioria dos estudos realizados com este composto biativo não referem este parâmetro.

➤ **Modelo matemático**

Foi ajustado o modelo matemático ao rendimento de secagem, em percentagem, associado a cada uma das amostras do desenho experimental, em função das duas variáveis independentes (temperatura do ar de entrada e percentagem de GA), mas não foi obtido um ajuste satisfatório, visto que os valores R^2 obtidos ($R^2=0,67072$ e $R^2_{ajustado}=0,34145$) são baixos ($R^2 < 0,8$).

4.2.2. Caracterização das micropartículas

4.2.2.1. Morfologia e tamanho

A caracterização da morfologia das partículas é um parâmetro muito importante em ter em conta, uma vez que a morfologia das partículas tem influência em algumas propriedades e pode alterar a capacidade de proteger a substância ativa face aos fatores externos (Beirão-da-Costa *et al.*, 2013). As figuras 12, 13, 14 e 15 mostram as imagens SEM obtidas pelo *Spray drying* equivalentes aos 9 ensaios de acordo com a matriz fatorial em função da temperatura do ar de entrada e a concentração de %GA.

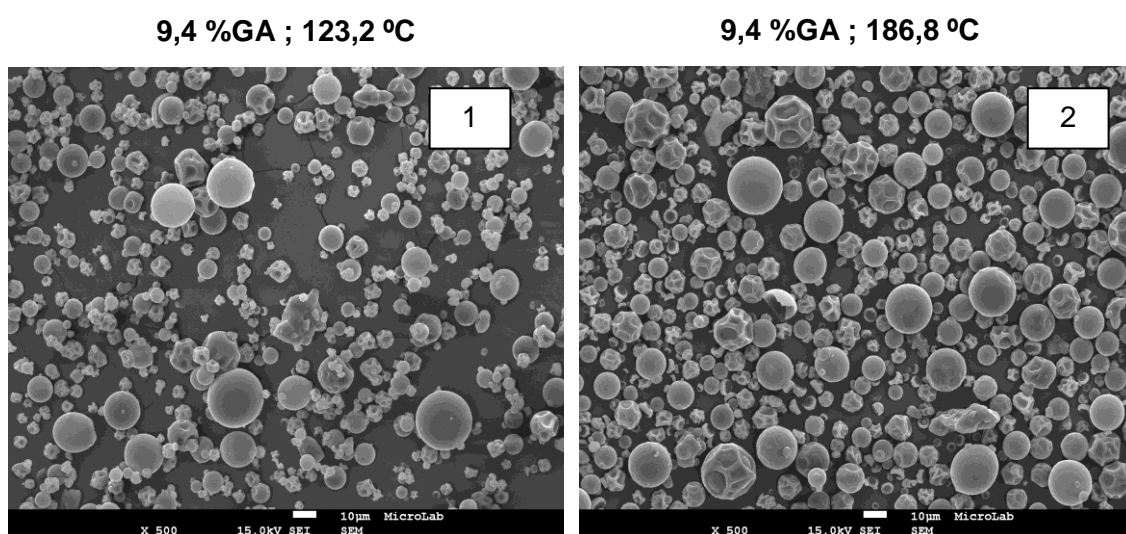


Figura 12 – Imagens SEM das amostras 1 e 2 com igual %GA e diferente temperatura (ampliação 500x)

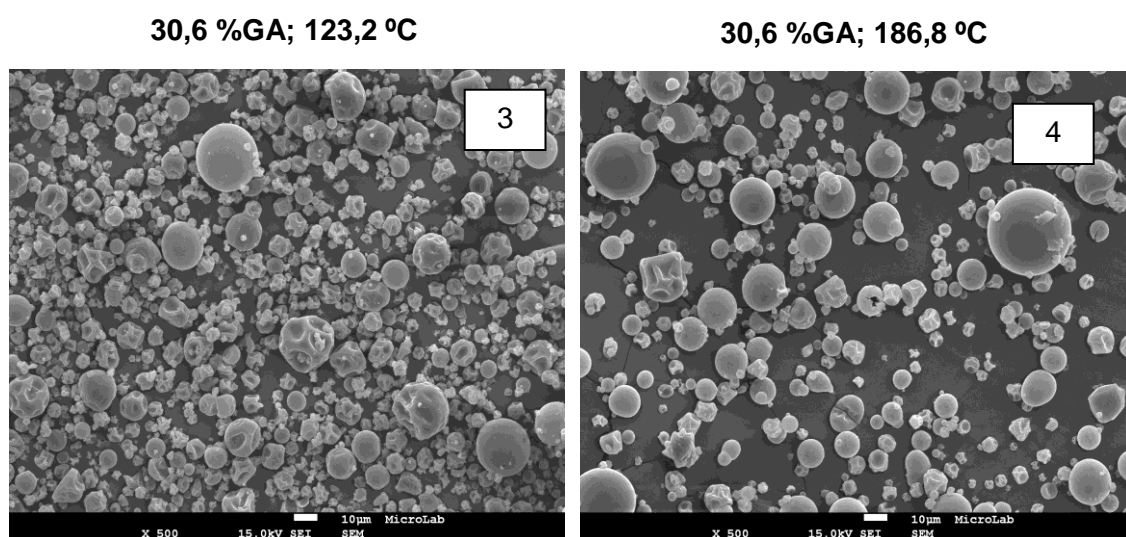


Figura 13 – Imagens SEM das amostras 3 e 4 com igual %GA e diferente temperatura (ampliação 500x)

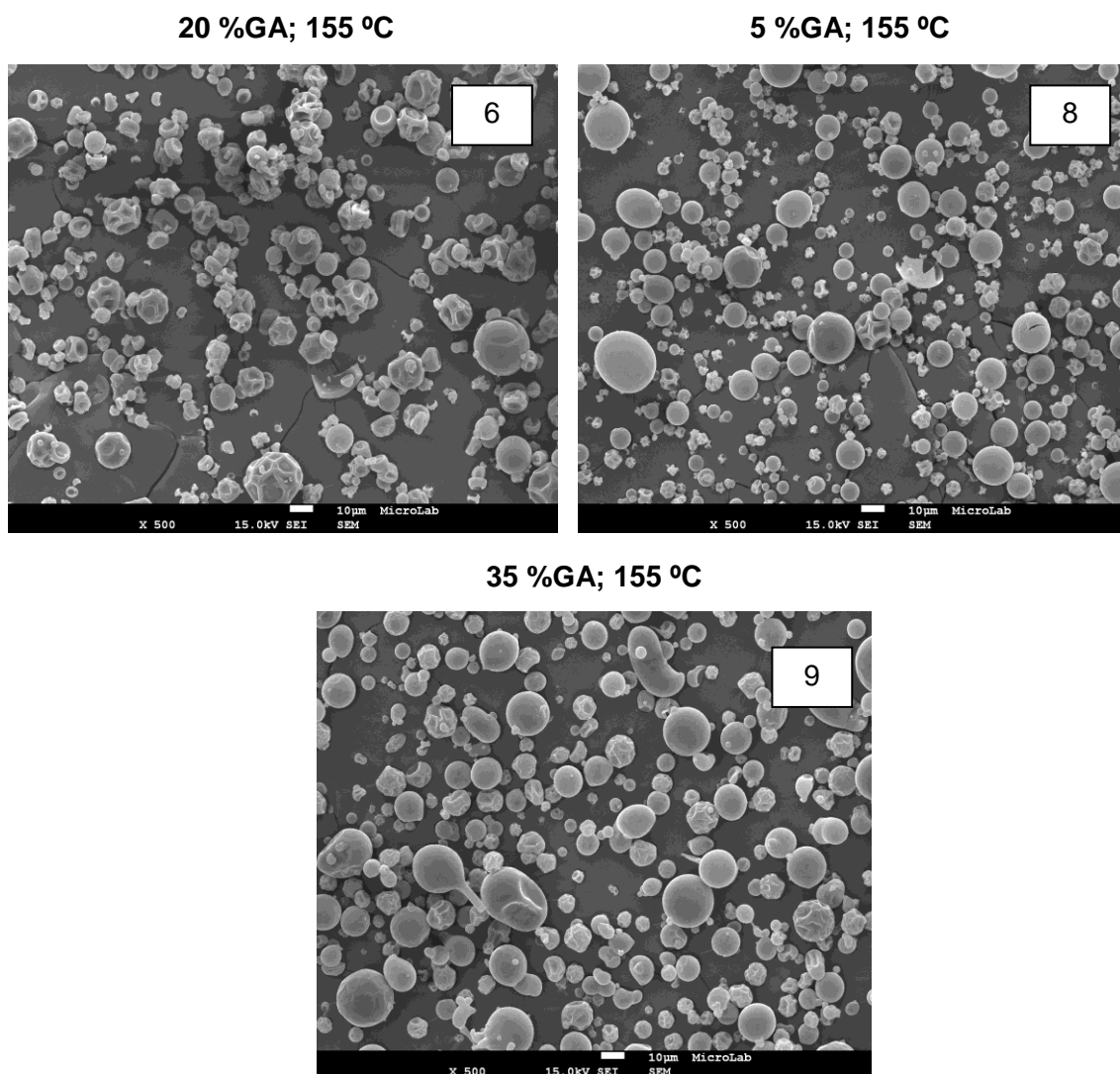


Figura 14 – Imagens SEM das amostras 6,8 e 9 com diferentes %GA e a mesma temperatura (ampliação 500x)

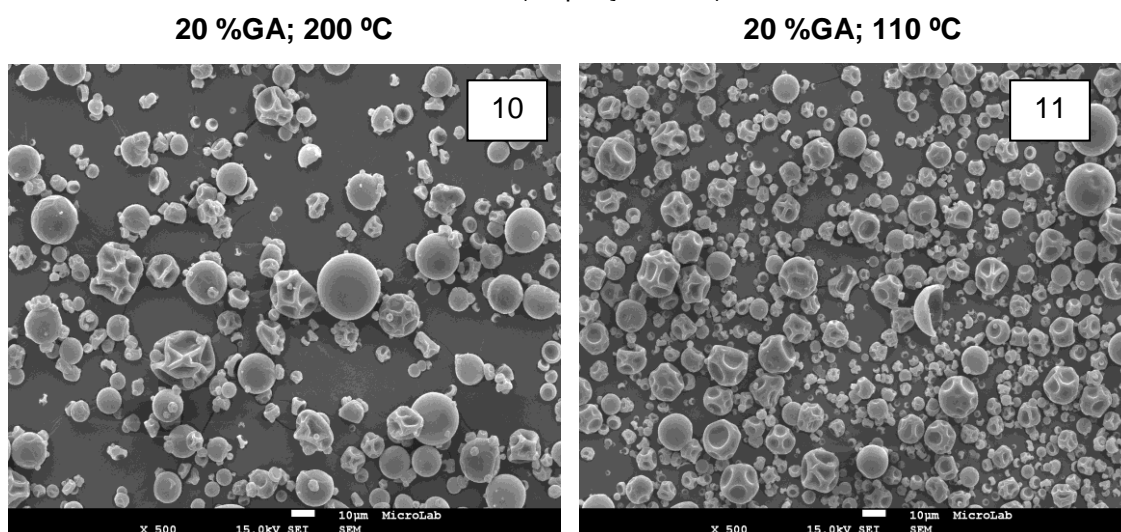


Figura 15 – Imagens SEM das amostras 10 e 11 com igual %GA e diferente temperatura (ampliação 500x)

Analisando, as imagens SEM equivalentes aos nove ensaios, verifica-se que no geral as partículas de β -caroteno com GA apresentam morfologias semelhantes e que temperatura do ar de entrada e a %GA são fatores que afetam a morfologia das partículas.

As partículas evidenciam, no geral, uma mistura de partículas esféricas inteiras com paredes lisas e partículas deformadas com superfícies enrugadas/amassadas com concavidades (colapsadas) ou até mesmo só partículas lisas ou enrugadas. De acordo com a classificação descrita por Walton (2000), as partículas obtidas enquadram-se na categoria de *skin forming* (cápsulas).

Analisando as partículas tendo em conta as condições de secagem que foram submetidas e a %GA presente verifica-se que na figura 13, quando a temperatura é de 123,2 °C existem mais partículas com concavidades do que partículas lisas. Enquanto que quando a temperatura é de 186,8 °C evidencia-se o contrário, visto que existe uma maior expressão de partículas lisas face às partículas colapsadas. O que leva a concluir que com o aumento da temperatura mantendo a mesma %GA as partículas são mais lisas e com a redução da temperatura as partículas são mais enrugadas, o que se encontra de acordo Alamilla-Beltrán *et al.* (2005). Por outro lado, a partir da análise da figura 14, verifica-se que quando a percentagem de goma arábica é de 20% (amostra 6) as partículas são enrugadas, enquanto que no caso de 35% de GA (amostra 9) as partículas são lisas. O que leva a constatar que o aumento de %GA mantendo a mesma temperatura, ocorre uma maior expressão de partículas lisas. Por último, a figura 15 não evidencia diferença na morfologia das partículas, uma vez que tanto na amostra 10 e 11 existe uma mistura de partículas inteiras e colapsadas.

Segundo, Fang & Bhandari (2010), a forma típica de partículas obtidas através da secagem por pulverização é esférica, com um tamanho médio de 1-100 μm . O tamanho das partículas obtidas pelo processo de *Spray drying* é definido pelas propriedades físicas da emulsão (como por exemplo concentração de sólidos e viscosidade), pelos parâmetros operacionais utilizados na atomização (diâmetro de noozle, etc), bem como pelas condições de secagem (temperatura do ar de entrada) (Jafari *et al*, 2008). Assim, como nem todas as amostras foram submetidas às mesmas condições, nem todas as partículas apresentam o mesmo tamanho, havendo por isso diferentes distribuições de diâmetro de partícula tal como se pode observar pelas figuras 16 e 17.

Com base na análise dos gráficos abaixo representados (figura 16 e 17) é possível constatar que, em todas as amostras analisadas, a maior parte das partículas, cerca de 56%, apresenta uma distribuição do diâmetro de partícula no intervalo [5-10[μm . As restantes encontram-se distribuídas, aproximadamente, da seguinte forma, 29% das partículas têm diâmetro entre [10,15[μm , 13% das partículas têm diâmetro entre [0-5[μm e por último apenas cerca de 2% têm diâmetros superiores a 15 μm .

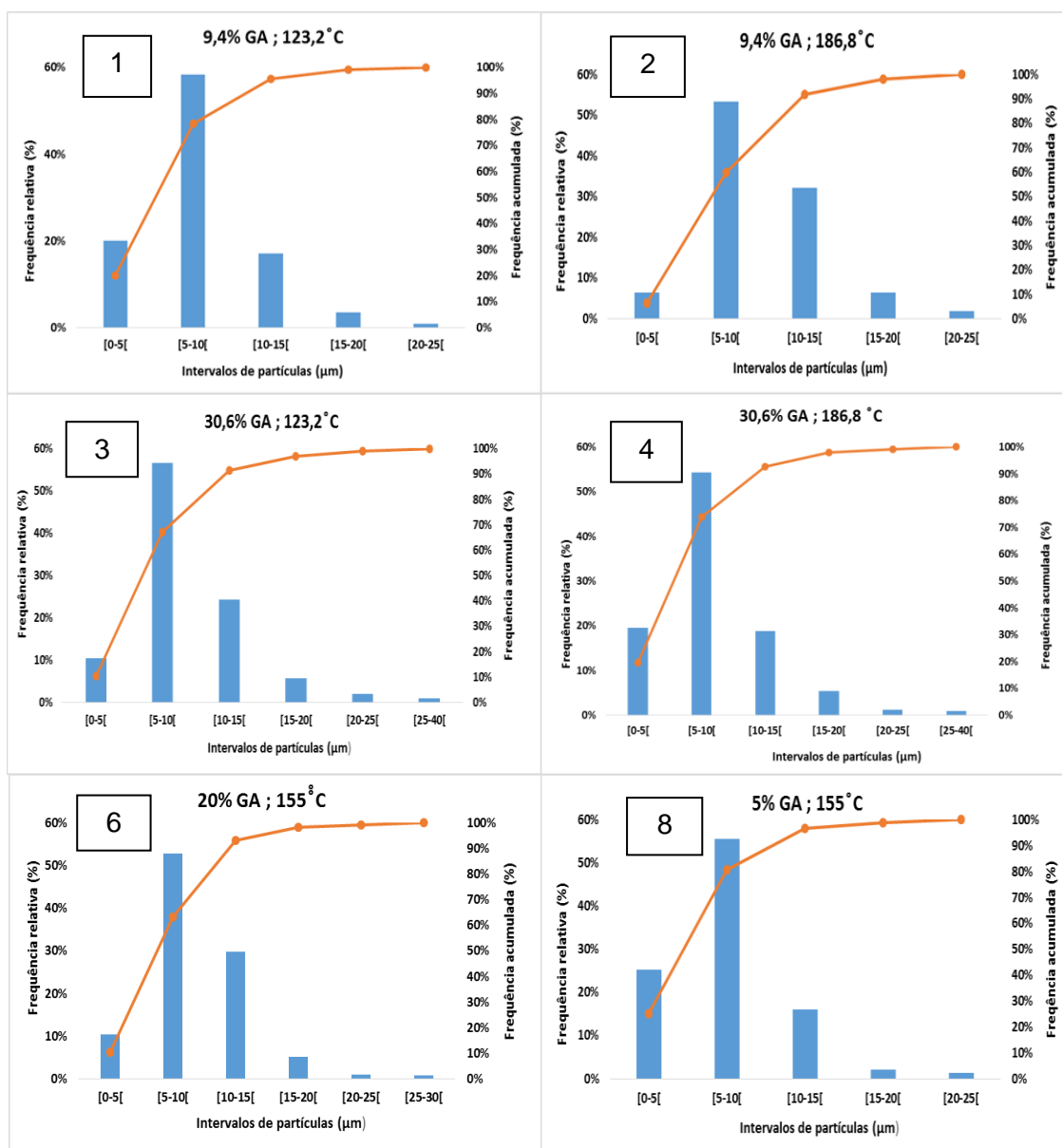


Figura 16 – Frequência relativa (barras) e frequência acumulada (linha) das amostras 1, 2, 3, 4, 6 e 8 observadas através das imagens SEM

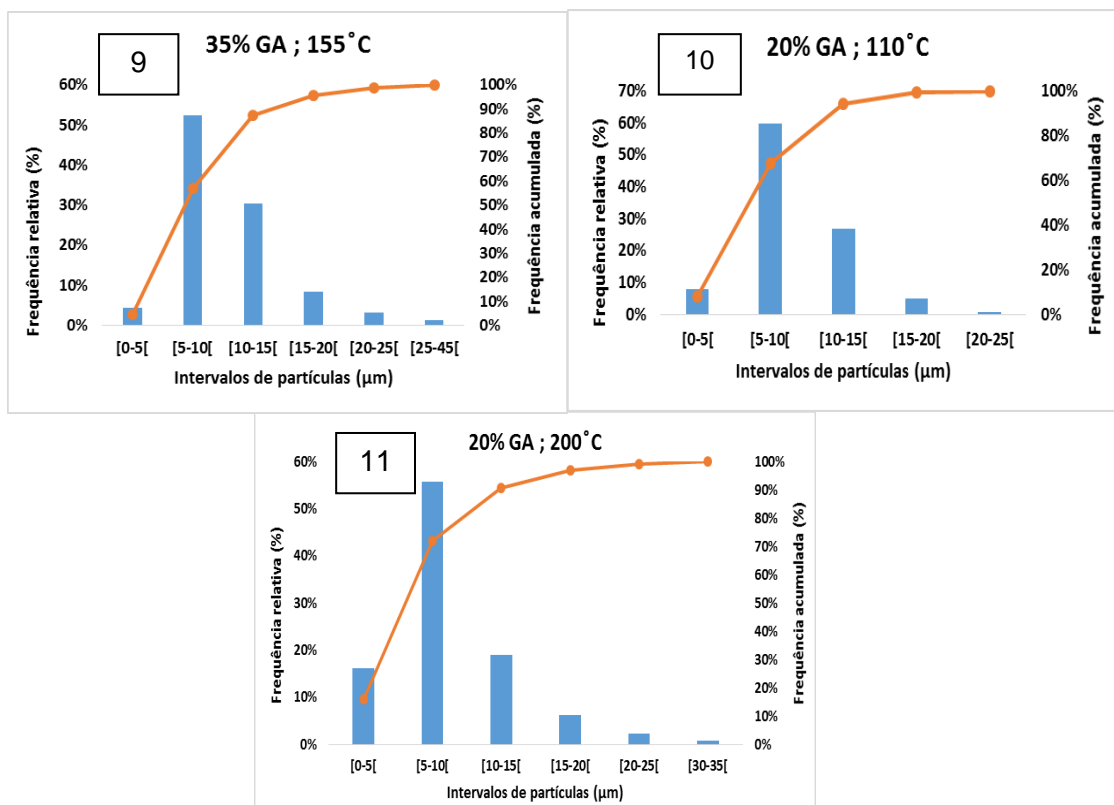


Figura 17 – Frequência relativa (barras) e frequência acumulada (linha) das amostras 9,10 e 11 observadas através das imagens SEM

Segundo Walton (2000), quando temperatura de secagem aumenta, o tamanho das partículas também aumenta. No entanto, no presente estudo não se verificou, visto que a maior parte partículas obtidas, obtiveram tamanhos semelhantes mesmo com o aumento ou redução da temperatura, excepto no caso da amostra 11 face à amostra 10, uma vez que se verificou um aumento do tamanho das partículas quando a temperatura aumentou de 110 °C para 200 °C.

Por outro lado, segundo alguns estudos, as diferenças observadas no caso da morfologia como no diâmetro das partículas está relacionado com as propriedades físicas e químicas do caudal de alimentação. Assim, o aumento da percentagem do teor de sólidos do caudal de alimentação traduz-se num aumento do tamanho das partículas (Beirão-da-Costa *et al.*, 2013). No presente estudo, esta correlação só se verificou no caso de algumas amostras, como por exemplo no caso da amostra 1 face à amostra 3 e na amostra 8 em face à 9, uma vez que se verificou um aumento do tamanho das partículas quando a percentagem aumentou de 9,4% para 30,6% e de 5% para 35%, respetivamente.

4.2.2.2. Carregamento das partículas em β -caroteno e eficiência de encapsulação

Tal como referido neste trabalho, após a quantificação do β -caroteno presente nas micropartículas determinou-se o carregamento das partículas em β -caroteno. Na tabela 12, encontram-se os resultados obtidos do carregamento de partículas e a eficiência de encapsulação, equivalentes a cada amostra associados a cada desenho experimental.

Tabela 11 – Carregamento de partículas em β -caroteno e eficiência de encapsulação (%) associado a cada desenho experimental

Amostra	%GA	T°C	Carregamento de partículas (mg de β -caroteno/ g de micropartícula)	%EE
1	9,4	123,2	22	9,7
2	9,4	186,8	27	14
3	30,6	123,2	24	7,8
4	30,6	186,8	28	9
5	20	155	16	13,7
6	20	155	15	8,8
7	20	155	16	13,6
8	5	155	33	15,6
9	35	155	26	12
10	20	110	11	6
11	20	200	35	24

Relativamente ao carregamento de partículas em β -caroteno, verifica-se que as onze formulações obtiveram um valor abaixo de 0,035 g (3,5%) de β -caroteno/ g de micropartícula. Segundo o estudo realizado por Donhowe *et al.* (2010), a quantidade de β -caroteno/ g micropartícula foi de 0,08%. Desta forma verifica-se, mesmo não tendo as mesmas condições do presente estudo, o valor obtido é mais elevado face à literatura apresentada.

Por outro lado, verifica-se pela análise da tabela 12 que a eficiência de encapsulação aumenta com o aumento da temperatura do ar de entrada. O que é comprovado através das amostras 1-2, 3-4 e 10-11. Por outro lado, quando se aumenta a %GA, mantendo a mesma temperatura, a %EE diminui (exemplo: amostra 8-9 e 8-7).

Neste presente estudo a eficiência de encapsulação das onze formulações estudadas variaram entre 6-24%. Donhowe *et al.* (2010) obtiveram uma eficiência de 37,7% através da encapsulação de β -caroteno (dispersável em glóbulos de água – 10%) com maltodextrina por *Spray drying*⁶. Rodríguez-Huezo *et al.* (2004) obtiveram valores de %EE entre 25,6 e 87,5% no encapsulamento de diversos pigmentos (oleorresina de pimentões vermelhos e oleorresina saponificado) a diferentes concentrações de carotenóides (β -caroteno, luteína, criptoxantina, zeaxantina, capsantina, violaxantina, epóxidos) com goma arábica, goma de gel e maltodextrina através do *Spray drying*⁷. Uma vez que os estudos, anteriormente descritos, não apresentam exatamente as mesmas condições que no presente estudo, não é possível fazer uma comparação direta, no entanto verifica-se que a eficiência de encapsulamento obtida é baixa face aos mesmos.

Os parâmetros de secagem, as especificações da emulsão, as propriedades do material de parede e as características do composto bioativo são aspetos influenciam a eficiência de encapsulação (Jafari *et al.*, 2008). Desta forma, o reduzido valor de EE% obtido pode estar relacionado com estes fatores. No entanto a ação da temperatura e as características do composto bioativo podem estar mais relacionadas, uma vez que o β -caroteno é facilmente oxidado quando exposto à luz, oxigénio e às altas temperaturas (Gómez-Romero *et al.*, 2007). Por outro lado, segundo Shu *et al.* (2006) a alta temperatura do ar de entrada pode levar ao desequilíbrio entre a evaporação e a taxa de formação das partículas, o que propociona a diminuição do valor da eficiência de encapsulamento.

⁶ **Condições de secagem segundo o estudo realizado por Donhowe *et al.* (2010):** Caudal de alimentação: 7,5 mL/min; Temperatura do ar de entrada e de saída: 170 ± 5 e 95 ± 5 °C; Velocidade da bomba de 25%; Taxa de aspiração de 100%.

⁷ **Condições de secagem segundo o estudo realizado Rodríguez-Huezo *et al.* (2004):** Caudal de alimentação: 20 mL/min; Temperatura do ar de entrada e de saída: 170 ± 5 e 80 ± 3 °C; Pressao do ar. 2,8 bar.

➤ **Modelo matemático**

Foi ajustado o modelo matemático ao carregamento de partículas de β -caroteno, associado a cada uma das amostras do desenho experimental.

A tabela 12 mostra a estatística ANOVA associada ao modelo matemático, onde se encontram representados os fatores lineares (L), quadráticos (Q) e de interação (L by L) equivalentes às variáveis independentes (%GA e temperatura do ar de entrada).

Tabela 12 – Análise estatística ANOVA referente ao carregamento de partículas em β -caroteno

Factor	SS	df	MS	F	p-value
(1)%GA(L)	4,5098	1	4,5098	0,21501	0,662354
%GA(Q)	237,5215	1	237,5215	11,32411	0,019996
(2)Temperatura(L)	247,2770	1	247,2770	11,78922	0,018564
Temperatura(Q)	62,7978	1	62,7978	2,99396	0,144135
1L by 2L	0,1502	1	0,1502	0,00716	0,935836
Error	104,8742	5	20,9748		
Total SS	606,8651	10			

A análise estatística ANOVA mostra que foi obtido um ajuste satisfatório, visto que os valores R^2 obtidos ($R^2=0,82719$ e $R^2_{ajustado}=0,6543$) se encontram dentro dos valores aceitáveis ($R^2>0,8$). Analisando a tabela 13 verifica-se que os fatores que influenciam significativamente o carregamento de partículas em β -caroteno são o valor quadrático da goma arábica e o da temperatura do ar de entrada linear, visto que possuem um p-value $<0,05$ (valores a vermelho indicados na tabela 12).

A figura 18 apresenta a superfície resposta relativa ao carregamento das partículas em β -caroteno (variável dependente), expresso em mg de β -caroteno/ g de micropartícula, em função da temperatura do ar de entrada e da percentagem de GA (variáveis independentes).

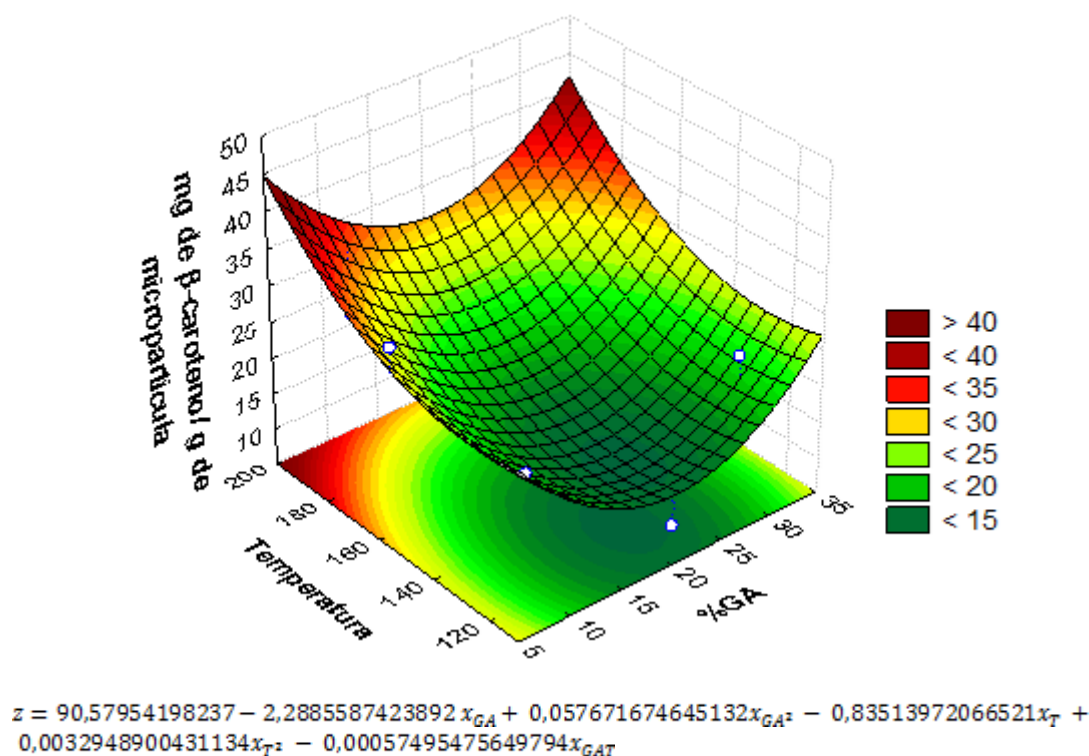


Figura 18 – Gráfico de RSM e equação respetiva relativa ao carregamento de partículas em β -caroteno

Através da análise da figura 18, verifica-se que com o aumento da temperatura do ar de entrada o grau de encapsulamento aumenta (200 °C ponto máximo de maior grau de encapsulação). Por sua vez, o aumento da percentagem de GA não leva a um grau de encapsulamento muito elevado, tanto que a 35% de GA (% máxima de GA analisada) a quantidade de β -caroteno por grama partícula é média (<30). No entanto, ao conjugar ambas as variáveis independentes, verifica-se que a 200 °C e a 35% de GA o grau de encapsulação é maior ou seja nestas condições a percentagem de β -caroteno encapsulado por grama de partícula é maior.

Com base nesta condição de maior carregamento de partículas (200 °C e 35% de GA), tal como foi dito anteriormente, realizou-se o encapsulamento do ERTC com GA. No entanto, de forma a testar outra temperatura de secagem escolheu-se também a temperatura de 110 °C para se realizar a encapsulação com a mesma %GA (35%).

Foi também ajustado um modelo matemático ao valor da eficiência de encapsulação, mas o ajustamento não resultou visto que o R^2 não se encontrava dentro dos valores aceitáveis ($R^2=0,59452$; $R^2_{ajustado}=0,1890$).

4.2.2.3. Atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado

Na tabela 13, encontram-se os resultados referentes à atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado (TEAC), obtidos a partir do método ABTS, associados a cada amostra de acordo com o desenho experimental.

Tabela 13 – Atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado associado a cada desenho experimental

Amostra	%GA	T°C	TEAC (μmol de trolox / g de β -caroteno)
1	9,4	123,2	$5,24 \times 10^2$
2	9,4	186,8	$1,15 \times 10^2$
3	30,6	123,2	$7,60 \times 10^2$
4	30,6	186,8	$2,44 \times 10^2$
5	20	155	$5,00 \times 10^2$
6	20	155	$2,77 \times 10^2$
7	20	155	$1,76 \times 10^2$
8	5	155	$4,99 \times 10^1$
9	35	155	$3,04 \times 10^2$
10	20	110	$3,65 \times 10^2$
11	20	200	$1,22 \times 10^2$

Analisando a tabela 13, constata-se que quando a temperatura aumenta mantendo a mesma %GA o valor de TEAC diminuiu (Exemplos: amostras 1-2 e 10-11). No entanto, quando a %GA aumenta de 20% para 35% o TEAC aumenta. Por outro lado, quando a percentagem percentagem de GA mantendo a mesma temperatura aumenta o TEAC Tal como se pode observar através da amostra 8 face às amostras 7 e 9.

A funcionalidade do β -caroteno, por exemplo o seu poder antioxidante, está dependente das propriedades físicas após o *Spray drying*. Assim, caso o extrato de micropartículas β -caroteno com GA fique durante muito tempo exposto ao oxigénio, luz e temperaturas excessivas a propensão para a sua degradação oxidativa é maior (Adaptado de Donhowe *et al.*, 2014) o que leva por sua vez à perda do carotenóide encapsulado e como consequência leva à redução capacidade antioxidante.

Comparando os valores da atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado, que se encontram na tabela 13, com o valor da capacidade antioxidante deste carotenóide

antes de ser encapsulado ($2,35 \times 10^3$ μmol de trolox / g de β -caroteno), verifica-se que houve uma diminuição da capacidade antioxidante (TEAC) do β -caroteno após ser encapsulado com GA. Este fato não deveria acontecer, uma vez que o encapsulamento é uma técnica que permite preservar os compostos bioativos (Ray *et al.*, 2016). O que leva a constatar que a matriz GA ao ser encapsulada com o β -caroteno nestas condições, não protege o mesmo da ação das altas temperaturas.

➤ Modelo matemático

Foi ajustado uma equação de 2º grau ao valor da atividade antioxidante do β -caroteno encapsulado, referente às onze formulações do desenho experimental, em função das duas variáveis independentes (temperatura do ar de entrada e percentagem de GA), mas o ajustamento não resultou ($R^2=0,60614$; $R^2_{\text{ajustado}}=0,2122$).

4.3. Encapsulamento do extrato de repiso do tomate concentrado com goma arábica

4.3.1 Processo de encapsulação por *Spray drying*

O rendimento de secagem associado a cada amostra, bem como as condições de secagem, a quantidade de micropartículas recolhidas após o *Spray drying* e a quantidade de material de parede adicionado em cada emulsão encontra-se na tabela 14.

Tabela 14 – Rendimento de secagem associado a cada amostra

Amostra	%GA	T°C	Micropartículas recolhidas (g)	%RS
1	35%	200 °C	3,776	21,58
2		110 °C	0,918	5,25

Analisando a tabela 14, verifica-se que com o aumento da temperatura do ar de entrada de 110 para 200 °C o rendimento de secagem aumenta, o que é comprovado através do aumento de 5,25 para 21,58%. O valor mais alto de RS% deve-se ao fato de a secagem ser mais rápida, o que se traduz numa maior perda de água no interior das partículas (Kha *et al.* 2010), reduzindo assim a probabilidade de as mesmas aderirem às paredes da câmara de secagem aumentando assim a quantidade de

partículas recolhidas através do ciclone (3,776 gramas). Por outro lado, o baixo valor de rendimento, no caso das amostras submetidas a uma temperatura de 110 °C, está relacionado por ser uma secagem mais demorada, propocionando uma maior adesão das partículas às paredes da câmara, em vez de se depositarem no ciclone (Prinn *et al.*, 2002), o que faz com que a quantidade de micropartículas recolhidas seja reduzida, 0,918 gramas, e por sua vez diminua o rendimento de encapsulamento.

Segundo o estudo realizado por Shu *et al.* (2006), o valor do rendimento de secagem obtido variou entre 76,1 e 91,5% no encapsulamento de licopeno (obtido a partir da purificação do oleoresina de licopeno extraído da pasta de tomate) com gelatina e sacarose através do *Spray drying*⁸. Nunes & Mercadante (2007) obtiveram um RS% de 51 ± 1% através do encapsulamento de cristais de licopeno com goma arábica e sacarose. Apesar da os estudos acima descritos não terem as mesmas condições do presente estudo, verifica-se que os valores de rendimento de secagem são baixos em relação aos mesmos. Este reduzido %RS pode dever-se possivelmente à deposição da emulsão, que não é atomizada, nas paredes da câmara de secagem (Johansen *et al.*, 2000).

⁸**Condições de secagem segundo o estudo realizado por Shu *et al.* (2006):** Caudal de alimentação: 100 mL/h, velocidade do ar quente 2 m/s, funcionamento do atomizador em co-corrente

4.3.2. Caracterização das micropartículas

4.3.2.1. Morfologia

As imagens SEM, apresentadas nas figuras 19 e 20, correspondem à morfologia das partículas de ERTC com GA obtidas pelo *Spray drying* quando submetidas às temperaturas de secagem de 110 °C e 200 °C, respetivamente.

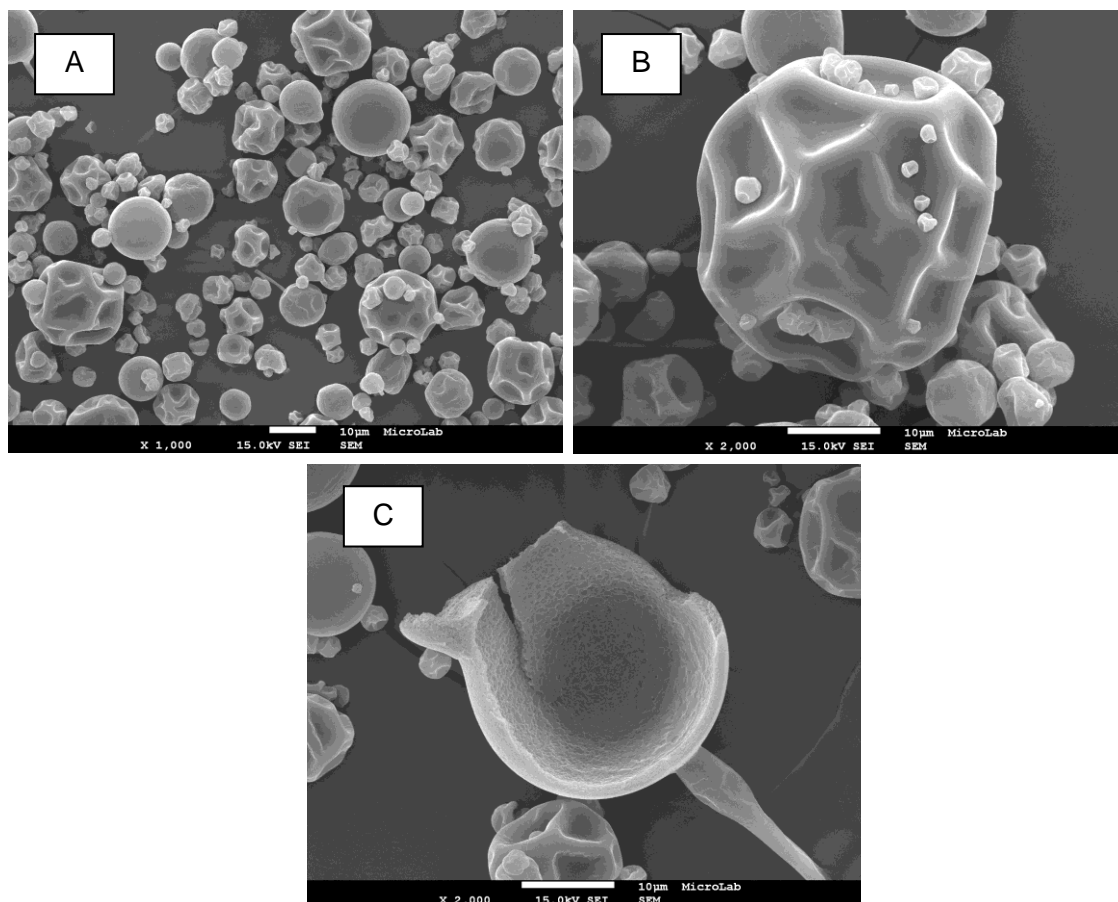


Figura 19 – Imagens SEM (35 % de concentração de GA e 110 °C de temperatura do ar de entrada). (A) partículas lisas e enrugadas (1000 x); (B) partícula enrugada (2000x) (C) corte seccional de uma partícula (2000x)

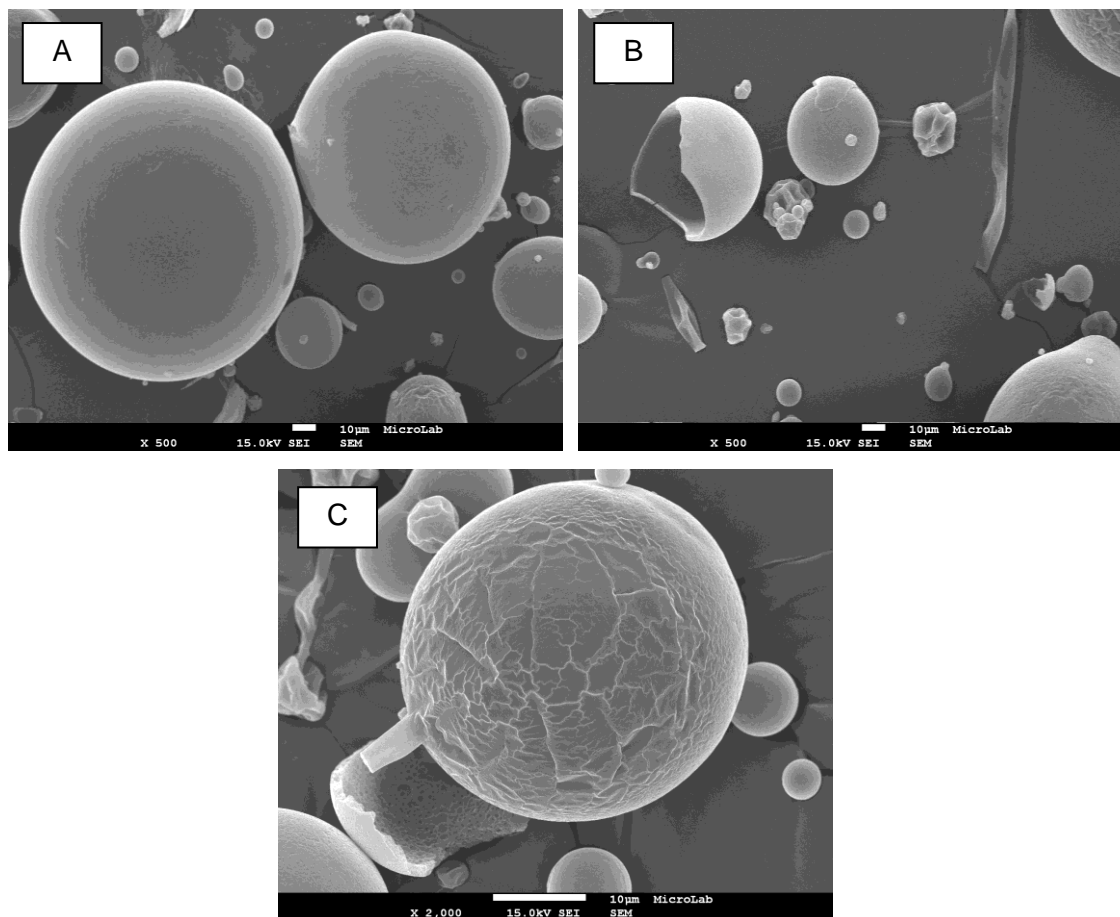


Figura 20 – Imagens SEM (35 % de concentração de GA e 200 °C de temperatura do ar de entrada). (A) partículas lisas (500 x); (B) corte seccional de um partícula lisa oca (2000x) (C) corte seccional e parede de partícula lisa (2000x)

Analisando as figuras 19 e 20, verifica-se que no mesmo campo microscópico existem partículas com diferentes estruturas, apresentando uma mistura de partículas lisas e enrugadas, existindo uma maior expressão de umas em relação às outras consoante a temperatura de secagem, tal como aconteceu nas micropartículas de β -caroteno com GA.

No caso da temperatura de secagem de 110 °C (figura 19), as partículas são na maioria deformadas de estrutura enrugadas/amassadas com concavidades (colapsadas) (figura 19-B). Os mecanismos envolvidos no encolhimento e deformação das partículas ocorrem quando a temperatura de secagem é baixa (secagem mais demorada). A baixas temperaturas, a taxa de difusão da água é mais lenta e as partículas têm mais tempo para encolherem e colapsarem (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005; Beirão-da-Costa, 2013).

Relativamente às imagens SEM, equivalentes à temperatura de 200 °C (figura 20), as partículas são maioritariamente esféricas e apresentam diferentes superfícies externas, superfície externa lisa sem fissuras ou porosidade aparente (figura 20-A) e superfícies com algumas fissuras (figura 20-C). Quando as partículas são submetidas a temperaturas de secagem altas, as mesmas tendem a inchar e apresentam uma forma esférica. Estes fenómenos estão relacionados com a ocorrência de uma rápida evaporação da água e pelas altas pressões que se geram derivadas da alta temperatura que as partículas são submetidas (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005; Jafari *et al.*, 2008).

Em todas as imagens SEM, as partículas apresentaram no seu interior um volume vazio – vacúolo (Figura 19-C e Figura 20-B e C). A formação do vacúolo resulta do fenómeno de encolhimento que ocorre após o endurecimento da parede exterior seguido da expansão de bolhas de ar no interior das partículas (Fernandes *et al.*, 2014; Rodríguez-Huezo *et al.*, 2004). A expansão térmica do ar no interior das partículas, dependendo do tempo de secagem e das propriedades do material de parede, permite reduzir o fenómeno de encolhimento (Fernandes *et al.*, 2014). Desta forma, como a 200 °C, a secagem é mais rápida, a probabilidade de existirem partículas enrugadas é menor. Por outro lado, elevada temperatura permite que se forme uma membrana semi-permeável em torno do composto bioativo e em certos casos pode levar à formação de balão. O fenómeno de balão ocorre quando é criado vácuo no interior da partícula, o que leva à produção de uma partícula oca de parede fina (figura 23-B e C) (Jafari *et al.*, 2008).

Segundo diversos autores, a retenção dos compostos bioactivos é afetada pelas condições de secagem (Jafari *et al.*, 2008). A existência de fenómenos de encolhimento e fissuras nas partículas tem influência sobre a quantidade de composto bioactivo encapsulado, levando desta forma à perda volátil do composto presente (Botrel *et al.*, 2012). Assim, as partículas que tenham superfície lisa permitem proteger e reter melhor o composto bioativo (Rocha *et al.*, 2012; Nunes & Mercadante, 2007).

Relativamente ao tamanho das partículas, verifica-se através da figura 21 que as partículas apresentam uma distribuição de diâmetro diferente consoante a temperatura em questão. A 110 °C, 55% das partículas possui maioritariamente um diâmetro de [5-10[µm, 32% entre [10-15[µm, 23% entre [0-5[µm e por último 1% possui um diâmetro superior a 15 µm. Por outro lado, a 200 °C, a maior parte das partículas, aproximadamente 49%, possui um diâmetro de partícula entre [0-5[µm. As restantes

partículas distribuem-se da seguinte forma, 28% entre [5-10[, 11% diâmetro entre [10,15[μm e em menor expressão, cerca de 6% das partículas apresentam diâmetros superiores a 15 μm . No entanto, existe uma reduzida proporção de partículas (3%) com diâmetro muito elevado ([25-95[μm), tal como se pode observar na figura 22-B.

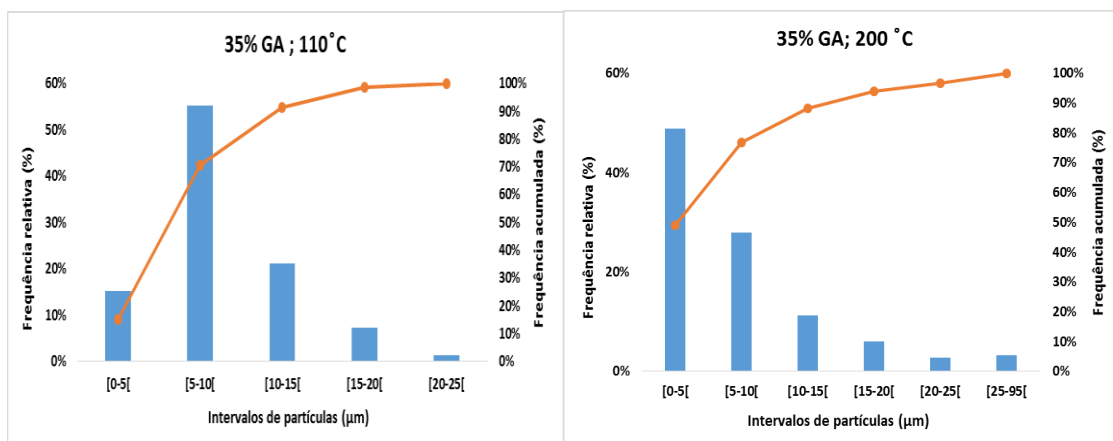


Figura 21 – Frequência relativa (barras) e frequência acumulada (linha) das micropartículas de ERTC com GA observadas através do SEM

O tamanho de partícula é influenciado pelas condições de secagem, do método de atomização utilizado e pelas características e concentração do composto bioativo (Jafari *et al.*, 2008). Segundo, Walton (2000) e Jafari *et al.* (2008) a alta temperatura do ar de entrada permite produzir partículas com um diâmetro maior face à secagem sob condições de temperatura mais baixa. O que se encontra de acordo com o estudo realizado, visto que houve um aumento do tamanho das partículas quando a temperatura aumentou de 110 °C para 200 °C, tal como se pode observar através da figura 21 e 22.

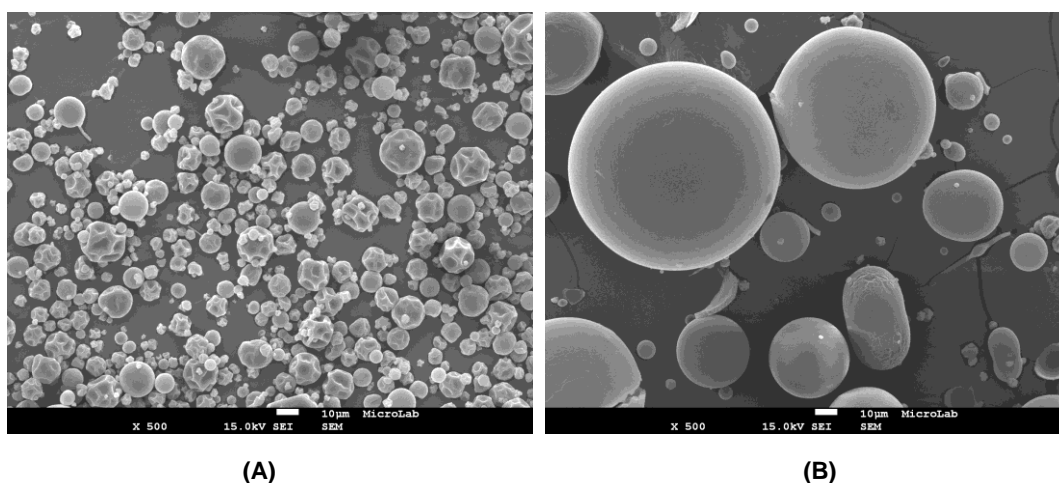


Figura 22 – Imagens SEM das partículas equivalentes à temperatura de 110 °C (A) e à de 200 °C (B) (ampliação 500x)

Comparando as micropartículas de ERTC com as de β -caroteno quanto ao seu diâmetro, verifica-se que as micropartículas de β -caroteno, submetidas às condições de secagem a 110 °C e com 20% de GA (Amostra 10 – figura 17) apresentam a mesma distribuição de diâmetro face às partículas de ERTC à mesma temperatura e a 35% de GA (figura 21). No entanto, as partículas de β -caroteno, a 200 °C e com 20% de GA (Amostra 11 – figura 17) já não apresentam o mesmo comportamento em comparação às partículas de ERTC submetidas à mesma temperatura mas com percentagem de GA de 35% (figura 21). Uma vez que nestas condições tal como foi dito anteriormente, as partículas de ERTC apresentam maioritariamente um diâmetro de [0-5[μm e o máximo diâmetro que possuem é de [25-95[μm . O que não acontece com as micropartículas de β -caroteno, visto que apresentam principalmente um diâmetro de [5-10[μm e o máximo diâmetro que possuem é de [20-25[μm .

4.3.2.2. Carregamento das partículas em ERTC e eficiência de encapsulação

Os valores do grau de encapsulação (carregamento das partículas em ERTC), da quantidade de partículas recolhidas e de carotenóide adicionado à emulsão, bem como eficiência de encapsulação das micropartículas de ERTC com GA, tendo em conta o licopeno e o β -caroteno encapsulado, encontram-se representados nas tabelas 15 e 16, respetivamente.

Tabela 15 – Grau e eficiência de encapsulação tendo em conta o licopeno encapsulado

Temperatura	Grau de encapsulação (g de licopeno/ g de micropartícula)	Quantidade de partículas recolhidas (g)	Quantidade de licopeno adicionado à emulsão (g)	%EE
200 °C	$1,4 \times 10^{-5}$	3,8	$3,68 \times 10^{-4}$	9,2
110 °C	$1,8 \times 10^{-5}$	0,9		4,4

Tabela 16 – Grau e eficiência de encapsulação tendo em conta o β -caroteno encapsulado

Temperatura	Grau de encapsulação (g de β -caroteno/ g de micropartícula)	Quantidade de partículas recolhidas (g)	Quantidade de β -caroteno adicionado à emulsão (g)	%EE
200 °C	$7,0 \times 10^{-6}$	3,8	$2,89 \times 10^{-4}$	8,8
110 °C	$1,2 \times 10^{-5}$	0,9		3,9

Analisando a tabelas 15 e 16, constata-se que há uma diminuição do grau de encapsulação com o aumento da temperatura, de 110 para 200 °C tanto no caso do licopeno como no β -caroteno. Segundo o estudo realizado por Quek *et al.*, (2007), que teve como objetivo o encapsulamento de sumo de melância (sumo que possui uma grande quantidade de carotenóides, nomeadamente licopeno) com 5% de maltodextrina através do *Spray drying*⁹, verificou-se que o aumento da temperatura do ar de entrada (de 145 para 175 °C) também provoca uma redução de licopeno e de β -caroteno. O que está correlacionado com o fato do licopeno e do β -caroteno serem facilmente oxidáveis quando expostos a altas temperaturas, o que faz com que haja oxidação térmica dos mesmos e por sua vez destruição dos compostos (Rocha *et al.*, 2012; Kha *et al.*, 2010). Assim, quando o ERTC é encapsulado com GA a 200 °C ocorre oxidação dos carotenóides presentes no mesmo (licopeno e do β -caroteno) e por sua vez leva à redução do grau de encapsulamento.

Relativamente à eficiência de encapsulação, verifica-se que com o aumento da temperatura de secagem, a eficiência de encapsulamento aumenta, o que não deveria acontecer. Uma vez que o grau de encapsulação diminuiu com o aumento da temperatura, o EE deveria também diminuir, visto que são parâmetros interligados. No entanto, o valor de %EE também é influenciado pela quantidade de micropartículas obtidas após o *Spray drying* e como à temperatura de 200 °C a quantidade recolhida foi maior que a 100 °C, esta diferença permite aumentar desta forma o valor de %EE.

Por outro lado a partir da análise dos valores apresentados na tabela 17, relativos a estudos realizados pela literatura, verifica-se que os valores de eficiência de encapsulação do presente estudo, mesmo não sendo possível fazer uma comparação direta uma vez que as condições são diferentes, são mais baixos face aos mesmos. Segundo, Shu *et al.* (2006) o balanço entre a evaporação e a taxa de formação das partículas pode ser alterado devido ao aumento da temperatura do ar de entrada, o que propicia a diminuição do valor da eficiência de encapsulação.

⁹ **Condições de secagem segundo o estudo realizado por Quek *et al.*, (2007):** Caudal de alimentação: 600 mL/h; Temperatura do caudal de alimentação: 20 °C; Temperatura do ar de entrada: 145, 155, 165 e 175 °C; Taxa de aspiração de 60%; Pressão do compressor: 4,5 bar.

Tabela 17 – Valores de eficiência de encapsulação (%) segundo estudos realizados pela literatura

Autores do estudo	Estudo realizado	%EE
Rocha <i>et al.</i> (2012)	Encapsulação de licopeno (15% de licopeno disperso em óleo) com amido modificado alimentar (Capsul) pelo <i>Spray drying</i> ¹⁰	21,01%
Donhowe <i>et al.</i> (2010)	Encapsulação de β -caroteno com maltodextrina por <i>Spray drying</i>	37,7%

4.3.2.3. Atividade antioxidante do ERTC encapsulado

Os valores obtidos da atividade antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS) do ERTC encapsulado associado a cada temperatura de secagem, bem como a capacidade antioxidante do ERTC encontram-se na tabela 18.

Tabela 18 – Atividade antioxidante do extrato antes e depois de ser encapsulado através do DPPH, FRAP e ABTS

Matéria-prima	Temperatura	TEAC (mmol de trolox/ g de extrato)	
		DPPH	FRAP
ERTC	–	176	382
		314	
Extrato de micropartículas de ERTC com GA	200 °C	47	44
		55	
	110 °C	8	13
		27	

¹⁰ **Condições de secagem segundo o estudo realizado por Rocha *et al.* (2012):** Caudal de alimentação: 10 mL/min; Temperatura do ar de entrada e de saída: 180 \pm 2 e 98 \pm 2 °C; Diâmetro de noozle de 0,5 mm.

Tal como podemos observar através da tabela 18, a capacidade antioxidante do ERTC diminuiu com após a sua secagem no *Spray drying*. Uma vez que se verifica que a capacidade antioxidante do extrato das micropartículas de ERTC com GA, quantificada pelos três métodos (DPPH, FRAP e ABTS), é muito menor face ao ERTC antes de ser encapsulado.

Por outro lado verifica-se que o aumento da temperatura do ar de entrada de 110 °C para 200 °C aumenta a atividade antioxidante do ERTC encapsulado.

Segundo o estudo realizado Kha *et al.* (2010), que teve como objetivo avaliar as propriedades do sumo do fruto Gac (fruto que possui valores elevados de carotenóides, principalmente de β -caroteno e licopeno) quando encapsulado com maltodextrina (a diferentes concentrações) a diferentes temperaturas através do *Spray drying*¹¹, verificaram que a atividade antioxidante, quantificada pelo método ABTS, reduz com o aumento da temperatura de 120 °C para 200 °C. Apesar do estudo descrito não apresentar as mesmas condições que o presente estudo, não é possível fazer uma comparação direta, no entanto este constraste de resultados pode estar relacionado pelo fato da amostra em estudo ser diferente e por isso as propriedades da mesma são diferentes, o que faz com que se comporte de maneira diferente face ao aumento da temperatura. Assim, com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o ERTC quando é submetido à temperatura de entrada de 200 °C a atividade antioxidante é preservada e por sua vez o seu encapsulamento com a matriz de GA a esta temperatura permite proteger o ERTC da oxidação/isomeração.

No entanto, verifica-se também que a atividade antioxidante das micropartículas é diferente nos três métodos, visto que cada um mede a atividade antioxidante da amostra em estudo a partir da captura de radicais específicos (Guo *et al.*, 2003).

¹¹ **Condições de secagem segundo o estudo realizado por Kha *et al.* (2010):** Caudal de alimentação: 12-14 mL/min; Temperatura do ar de entrada e temperatura do ar de saída respetivo: 120/83 °C, 160/103 °C, 180/112 °C e 200/125 °C; Taxa de fluxo de ar de secagem: 56 \pm 2 m³/h; Pressão de ar do compressor: 0,06 Mpa.

5. Conclusões e trabalho futuro

Neste trabalho estudou-se a estabilidade do repiso de tomate antes e depois de ser encapsulado com goma arábica através da técnica *Spray drying*. No entanto, antes de proceder à caracterização das partículas do repiso de tomate, realizaram-se ensaios de β -caroteno com goma arábica através de um desenho experimental fatorial com duas variáveis independentes.

Relativamente aos ensaios de β -caroteno com goma arábica, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a temperatura do ar de entrada de 200 °C e 35% de concentração de goma arábica, bem como a temperatura de 110 °C com 35% de goma arábica são as condições de secagem que permitem obter um grau de encapsulação mais elevado.

Quanto à caracterização das micropartículas de goma arábica com β -caroteno, em todas as formulações, as partículas apresentam no geral uma morfologia semelhante, mistura de partículas lisas e enrugadas com uma distribuição de diâmetro de partícula entre [5-10] μm na sua maioria. No entanto, conclui-se que a temperatura do ar de entrada e a percentagem de goma arábica afetam a morfologia e o tamanho das partículas, uma vez que quando o encapsulamento é realizado a elevadas temperaturas (por exemplo: 186,8 °C) as partículas são maioritariamente lisas e quando a concentração de goma arábica é elevada (35%) as partículas são por sua vez maiores e mais lisas.

Por outro lado, também se concluiu que a matriz goma arábica não protege totalmente o β -caroteno quando este é submetido a elevadas temperaturas, o que se traduz na redução da sua atividade antioxidante aquando do seu encapsulamento.

No que diz respeito ao encapsulamento de ERTC, conclui-se que é possível encapsular este composto bioativo com goma arábica através do *Spray drying*.

Relativamente às partículas com ERTC, as imagens SEM mostram que as temperaturas de secagem afetam a morfologia e tamanho das partículas com ERTC, o que é comprovado pelo fato das partículas evidenciarem morfologias diferentes consoante a temperatura em questão. A 110 °C, as partículas são maioritariamente

mais pequenas e deformadas (colapsadas) e a 200 °C, as partículas apresentam um diâmetro maior e são mais lisas.

No que diz respeito ao carregamento das micropartículas, os resultados obtidos mostram que a temperatura do ar de entrada afeta o grau de encapsulamento, o que é comprovado pela redução à temperatura de 200 °C. O que leva a concluir que o encapsulamento foi mais eficaz na preservação dos carotenóides presentes no repiso de tomate quando as condições de secagem foram de 110 °C e 35% de goma arábica.

Os resultados obtidos pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS mostram que, após o encapsulamento, a capacidade antioxidante dos compostos presentes no repiso de tomate diminuiu. No entanto a 200 °C, a atividade antioxidante é maior face à temperatura de 100 °C, o que leva a concluir que a 200 °C a matriz goma arábica é mais eficaz na manutenção da capacidade antioxidante.

Após a realização do presente trabalho de forma a dar continuidade ao mesmo proponho a realização de algumas análises. Desta forma destaco as seguintes:

- Optimizar as condições de encapsulação como:
 - Efectuar o processo de secagem com azoto ao invés de se utilizar ar;
 - Avaliar os efeitos de outros biopolímeros, como por exemplo inulina, maltodextrina e amido modificado após o seu encapsulamento com o extrato de repiso de tomate concentrado;
- Incorporação do repiso em pó, do extrato de repiso de tomate concentrado antes e depois de ser encapsulado e das micropartículas em sistemas alimentares;
- Estudar a estabilidade do repiso de tomate, antes depois de ser encapsulado, durante o seu armazenamento a diferentes temperaturas.

Referências bibliográficas

- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J.J., Jiménez-Aparicio, A.R. & Gutiérrez-López, G.F. (2005). "Description of morphological changes of particles along spray drying". In: *Journal of Food Engineering*. 67: 179-184.
- Amiri-Rigi, A. & Abbasi, S. (2016). "Analytical Methods- Microemulsion-based lycopene extraction: Effect of surfactants, co-surfactants and pretreatments. In: *Food Chemistry*. 197: 1002–1007.
- Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente C. & Regal, P. (2014). "Review of methods for analysis of carotenoids". In: *Trends in Analytical Chemistry*. 56:49–73.
- Ali, A., Maqbool, M., Alderson, P. G. & Zahid, N. (2013). "Effect of gum arabic as an edible coating on antioxidant capacity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during storage". In: *Postharvest Biology and Technology*. 76:119–124.
- Arts, M.J.T.J., Sebastiaan Dallinga, J., Voss, Hans-Peter, H. & Guido, A. B. R.M.M. (2004). "A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay". In: *Food Chemistry* 88: 567–570.
- Azabou, S., Abid, Y., Sebii, H., Felfoul, I, Gargouri, A. & Attia, H. (2016). "Potential of the solid-state fermentation of tomato by products by *Fusarium solani* pisi for enzymatic extraction of lycopene". In: *LWT - Food Science and Technology*. 68: 280–287.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. & Omar, A.K.M. (2013). "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review". In: *Journal of Food Engineering*. 117: 426– 436.
- Battista, C. A. D., Constenla, D., Ramírez-Rigo, M. V. & Pinã, J. (2015). "The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying". In *Powder Technology*. 286:193–201.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bournon, A., Pinheiro, A, Januário, M. I. N. , Vicente, A. A., Beirão-da-Costa, M. L. & Delgadillo, I. (2013). "Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil". In: *Food Hydrocolloid*. 33: 199-206.

- Bolanos de la Torre, A. A. S., Henderson, T., Nigam, P. S. & Owusu-Apenten R. K. (2015). "Short communication – A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey". In: *Food Chemistry*. 174:119–123.
- Borguini, R. G. & Torres, E. A. F. (2009). "Tomatoes and Tomato Products as Dietary Sources of Antioxidants". In: *Food Reviews International*. 25: 313–325.
- Botrel, D. A., Borges, S., V., Fernandes, R. V., Viana, A. D., Gomes da Costa, J. M. & Marques, G. R. (2012). "Original article - Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil". In: *International Journal of Food Science and Technology*. 47:2289–2296.
- Campos, E., Branquinho, J., Carreira, A.S., Carvalho, A., Coimbra, P., Ferreira, P. & Gil, M.H. (2013). "Review article – Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications". In: *European Polymer Journal*. 49: 2005–2021.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., de Vos, R. & Hall, R. D. (2010). "The Effect of Industrial Food Processing on Potentially Health-Beneficial Tomato Antioxidants". In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50: 919–930.
- Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M. V., Igartuburu, J. M. & Barroso, C. G. (2014). "Analytical Methods Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products". In: *Food Chemistry*. 165: 198–204.
- Chen, S. & Urban, P. L. (2015). "On-line monitoring of Soxhlet extraction by chromatography and mass spectrometry to reveal temporal extract profiles". In: *Analytica Chimica Acta*. 881: 74–81.
- Chen, L., Bai, G., Yang, R., Zang, J., Zhou, T., Zhao, G. (2014). "Encapsulation of β -carotene within ferritin nanocages greatly increases its water-solubility and thermal stability". In: *Food Chemistry*. 14:307–312
- Coronel-Aguilera, C. P. & San Martín-Gonzalez, M. F. (2015). "Encapsulation of spray dried β -carotene emulsion by fluidized bed coating technology". In: *LWT - Food Science and Technology*. 62: 187-193.
- Perez, J, C. A, R, A., De Prado, E., Cezon E., De La Vieja, A. & Morales, M. (2002). "Procedimento de preparação de β -caroteno". Disponível em :

<https://www.google.com/patents/WO2002010429A1?cl=es&hl=pt-PT>. Acesso a 08/09/16.

Directiva 2009/32/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril, Jornal Oficial, L 141, 2009.

Donhowe, E. G., Flores, F. P., Kerr, W. L., Wicker, L. & Kong, F. (2014). "Characterization and in vitro bioavailability of β -carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix". In: *LWT - Food Science and Technology*. 57: 42-48.

DRAPLVT – Direcção Regional de Agricultura e Pescas de Lisboa e Vale do Tejo. (2016). Tomate para indústria.

Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L. & Alves, A. (2013). "Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review". In: *Trends in Food Science & Technology*. 31:138–155.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of United Nations Statistics Division. (2016). Compare Data – Production: crops – tomatoes. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/compare/E> . Acesso a 28/05/2016.

Fang, Z. & Bhandari, B. (2010). "Encapsulation of polyphenols – a review". In: *Food Science & Technology*. 21: 510-523.

Fernandes, R. V. B., Borges, S. V. & Botrel, D. A. (2014). "Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil". In: *Carbohydrate Polymers* .101: 524–532.

Fuentes, E., Carle, R., Astudillo, L., Guzmán, L., Gutiérrez, M., Carrasco, G. & Palomo, I. (2013). "Research Article- Antioxidant and Antiplatelet Activities in Extracts from Green and Fully Ripe Tomato Fruits (*Solanum lycopersicum*) and Pomace from Industrial Tomato Processing". In: *Hindawi Publishing Corporation*. 1:1-9.

Gan, R., Kuang L., Xu, X., Zhang Y., Xia, E., Song, F. & Li, H. (2010). "Screening of Natural Antioxidants from Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Treatment of Rheumatic Disease". In: *Molecules*. 15:5988-5997.

George, B., Kaur, C., Khurdiya, D.S. & Kapoor, H.C. (2004). "Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype". In: *Food Chemistry*. 84: 45–51.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview". In: *Food Research International*. 40: 1107–1121.

GPP – Gabinete de Planeamento e Políticas. (2013). Ficha de internacionalização tomate para indústria. Disponível em:

<http://www.gpp.pt/GlobalAgriMar/informacao/docs/Produtos/Fichas/TomateFI.pdf>.

Acesso a 29/05/2016.

Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández- Gutiérrez, A. (2007). "Review Analytical determination of antioxidants in tomato: Typical components of the Mediterranean diet". In: *J. Sep. Sci.* 30: 452–461.

Gould, W. V. (1992). *Tomato production, processing and technology*. 3rd ed. Chap. 8, *Canning Tomatoes*. CTI Publications. Baltimore. 182 p.

Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A. C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S. & Biesalski, H. K. (2010). "β-carotene is an important vitamin A source for humans". In: *Journal of Nutrition*. 140(12): 2268S -2285S.

Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. & Jiang, Y. (2003). "Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay". In: *Nutrition Research*. 23:1719–1726.

Herrera, P. G., Sánchez-Mata, M.C. & Cámara, M. (2010). "Nutritional characterization of tomato fiber as a useful ingredient for food industry". In: *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11: 707–711.

Heuvelink, E. (2005). Tomatoes. In: Costa, J.M. & Houvelink, E. *Introduction: the Tomato Crop and Industry*. 1st ed. CABI Publishing. UK. 2 p.

Hosseini, A., Jafari, S. M., Mirzaei, H., Asghari, A. & Akhavan, S. (2015). "Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum". In: *Carbohydrate Polymers*. 126:1–8.

INE – Instituto Nacional de Estatística. (2014). Estatísticas Agrícolas de 2014.

- Luque de Castro, M.D. & Priego-Capote, F. (2010). "Review – Soxhlet extraction: Past and present panacea". In: *Journal of Chromatography A*. 1217: 2383–2389.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. & Bhandari, B. (2008). "Encapsulation Efficiency of Foods Flavours and Oils during Spray Drying". In: *Drying Technology*. 26: 816-835.
- Johansen, P., Merkle, H. P. & Gander, B. (2000). "Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying". In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 50: 413-417.
- Jones, J. B. (2008a). *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden*. In: Carver, G. W. 2nd edition Chap. 1, *Introduction*. CRC Press. New York, 1 p.
- Jones, J. B. (2008b). *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden*. In: Keiller, G. 2nd edition Chap. 2, *Plant characteristics and Physiology*. CRC Press. New York, 74 and 75 p.
- Kaur, D., Wani, A. A., Sogi, D. S. & Shivhare, U. S. (2006). "Sorption Isotherms and Drying Characteristics of Tomato Peel Isolated from Tomato Pomace". In: *Drying Technology*. 24(11): 1515–1520.
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Pyriochou, V., Peristeraki, A., Karathanos, V.T. (2012). "Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing by products". In: *LWT—Food Sci. Technol.* 49: 213–216.
- Keshani, S., Wan Daud, W. R., Nourouzi, M.M., Namvar, F. & Ghasemi, M. (2015). "Review – Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling". In: *Journal of Food Engineering*. 146: 152–162.
- Kha, T. C., Nguyen, M & Roach, P. D. (2010). "Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder". In: *Journal of Food Engineering*. 98: 385–392.
- Køcks, M., Banke, S.O., Madsen, B., Vaz, T., Carvalheira, M., Pandega, N., Sousa, I. & Dowler, N. S. (2013). "Real-Time Monitoring of Lycopene Content in Tomato-Derived Products during Processing: Implementation of a Novel DoubleSlit Raman Spectrometer". In: *Applied Spectroscopy*. 67 (6): 681-687.

- Liedl, B. E., Labate, J., Stommel, J. R., Slade, A. & Kole, C. (2013). *Genetics, genomics and breeding of tomato*. In Caicedo, A & Peralta, I. Charp. 1, *Economic and Nutritional Importance of tomato*. CRC Press. New York, 1–3 p.
- Liu, F., Wang, D., Sun, C., McClements, D. J. & Gao, Y. (2016). “Analytical Methods – Utilization of interfacial engineering to improve physicochemical stability of b-carotene emulsions: Multilayer coatings formed using protein and protein – polyphenol conjugates”. In: *Food Chemistry*. 205: 129–139.
- Luterotti, S., Bicanic, D., Markovi, K & Franko, M. (2015). “Carotenes in processed tomato after thermal treatment”. In *Food Control*. 48: 67–74.
- Masters, K. (1972). *Spray Drying – An Introduction to Principles, Operational Practice and Applications. Spray Drying fundamentals*. Leonard Hill Books. London. 11, 12, 14, 22 p.
- Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B. Hidayat & Amrun, M. (2013). “Analytical Methods A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity”. In: *Food Chemistry*. 141: 4102–4106.
- Murugesan, R. & Orsat, V. (2012). “Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients — A Review”. In: *Food Bioprocess Technol*. 5: 3–14.
- Nunes, I. L. & Mercadante, A. Z. (2007). “Encapsulation of Lycopene Using Spray-Drying and Molecular Inclusion Processes”. In: *Brazilian Archives Of Biology and Technology- International Journal*. 50(5): 893-900.
- Oroian, M. & Escriche, I. (2015). “Review – Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. In: *Food Research International*. 74: 10–36.
- Papaioannou, E. H., & Karabelas, A. J. (2012). “Lycopene recovery from tomato peel under mild conditions assisted by enzymatic pre-treatment and non-ionic surfactants”. In: *Acta Biochimica Polonica*. 59: 71–74.
- Perretti, G., Troilo, A., Bravi, E., Marconi, O., Galgano, F., & Fantozzi, P. (2013). “Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide”. In: *The Journal of Supercritical Fluids*. 82: 177–182.
- Poshadri, A. & Kuna, A. (2010). “Microencapsulation Technology: A Review”. In: *Journal Res. Angra*. 38 (1): 86–102.

- Poojary, M. M. & Passamonti, P. (2015). "Optimization of extraction of high purity all-trans-lycopene from tomato pulp waste". In: *Food Chemistry*. 188: 84–91.
- Porto, A. & Castro, L. (2007). Tabela da Composição dos Alimentos. 1^o edição. Lisboa: Centro de Segurança Alimentar e Nutrição e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- Preedy, V. R. & Watson, R. R. (2008). *Tomatoes and Tomato Products – Nutricional, Medicinal and Therapeutic Properties*. In: Inbaraj, B. S. & Chen, B. H. *Carotenoids in tomato plants*. Science Publishers. United States of America, 134 p.
- Prinn, K. B., Constantino, H. R., & Tracy, M. (2002). "Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale". In: *AAPS PharmSciTech*. 3:32-39.
- Quek, S.Y., Chok, N.K. & Swedlund, P. (2007). "The physicochemical properties of spray dried watermelon powders". In: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 46 (5): 386–392.
- Ray, S., Raychaudhuri, U. & Chakraborty, R. (2016). "An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology". In: *Food Bioscience*. 13: 76–83.
- Ranvee, R. C., Patil, S. N. & Sahoo, A. K. (2013). "Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste". In: *Food and bioproducts processing*. 91: 370–375.
- Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S. & Grosso, C. R. F. (2012). "Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules". In: *Food and Bioproducts Processing*. 90: 37–42.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. 1st edition. Chap 1, *Nature of Carotenoids in Foods*. ILSI PRESS – International Life Sciences Institute. Washington, 1-10.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I. & Vernon-Carter, E.J. (2004). "Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids". In: *Journal of Food Science*. 69 (7): E351-E359.

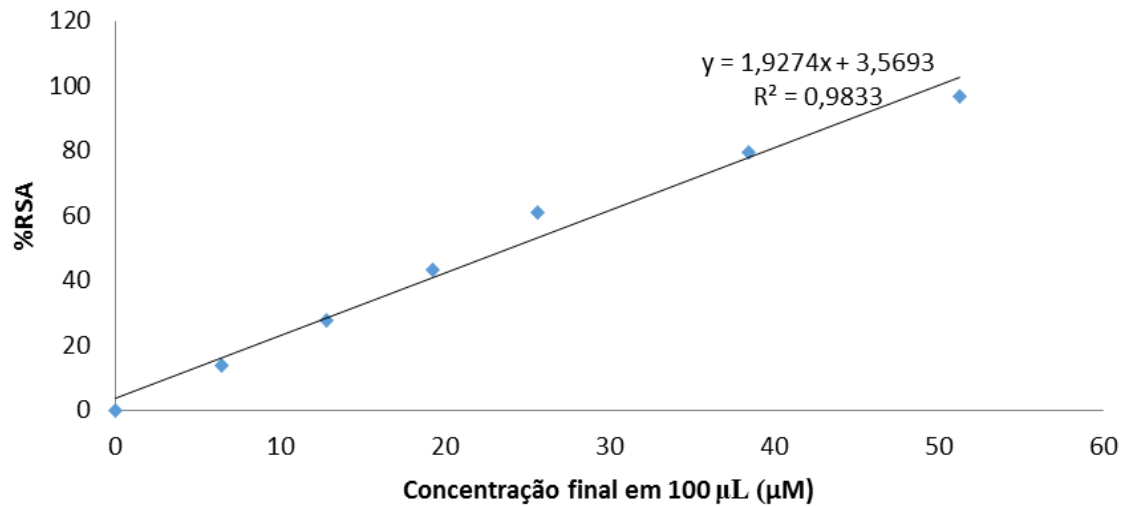
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. D. (2007a). "Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH". In: *ISSN* . 1679–6535.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. D. (2007b). "Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS". In: *ISSN*. 1679–6535.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. D. (2006). "Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)". In: *ISSN*. 1679–6535.
- Rutz, J. K., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Rosa, C. G. Silva, M. M. (2016). "Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food". In: *Food Chemistry*. 202: 324–333.
- Sahil, K., Akanksha, M., Premjeet, S., Bilandi, A. & Kapoor, B. (2011). "Microsphere: a review". In: *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*. 1(4): 2231-2781.
- Shi, J. & Le Maguer, M. (2010). "Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing". In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40 (1): 1-42.
- Shi, J., Mazza, G. & Le Maguer, M. (2002). *Functional Foods – Biochemical and Processing Aspects*. In Shi, J. M. M. & Bryan, M. Chorp. 4, *Lycopene from Tomatoes*. CRC PRESS. New York: 136–160 p.
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. & Liu, X. (2006). "Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying". In: *Journal of Food Engineering*. 76: 664-669.
- Strati, I.F. & Oreopoulou, V. (2014). "Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review". In: *Food Research International*. 65: 311–321.
- Techomic (1995). *Food additives: US products, applications, markets*. In: Techomic. *Hydrocolloid Gums: Natural products – Plant or Tree Exudates*. Techomic Publishing Company, Inc. Lancaster, 220–221 p.

- Torbica, A., Belovic, M., Mastilovic, J., Kevresan, Z., Pestoric, M., Skrobot, D., Hadnadev, T. D. (2016). "Nutritional, rheological, and sensory evaluation of tomato ketchup with increased content of natural fibres made from fresh tomato pomace". In: *Food and bioproducts processing*. 98:299–309.
- Três, M. V. Francheschi, E., Borges, G. R., Dariva, C., Corazza, F. C., Oliveira, J. V. & Corazza, M. L. (2007). "Effect of temperature on the solubility of β -carotene in organic solvents under ambient pressure". In: *Ciênc. Tecnol. Aliment.*. 27(4): 737-743.
- Vági, E., Simandiá, B., Vászargelyiné, K. P., Daood, H., Kéry, Á, Doleschall, F & Nagy, B. (2007). "Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products". In: *The Journal of Supercritical Fluids*. 40: 218–226.
- Walton, D. E. (2000). "The morphology of spray-dried particles a qualitative view". In: *Drying Technology: An International Journal*. 18 (9): 1943-1986.
- Whistler, R. L. (1973). *Industrial Gums – Polysaccharides and Their Derivatives*. In Glicksman M. 2nd ed. *Gum Arabic*. Academic Press Inc. New York, 201 p.
- Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q. & Su, G. (2016). "Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time". In: *Food Chemistry*. 92: 288–294.
- Zuidam, N.J. & Nedović, V.A. (2010). *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. In: Zuidam, N. J. & Shmoni, E. Chapter 2, *Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them*. Springer Science and Business. New York, 3–29 p.
- Zulueta, A., Esteve, M. J. & Frígola, A. (2009). "Analytical Methods – ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products". In: *Food Chemistry*. 114:310–316.
- Zuorro, A., Fidaleo, M. & Lavecchia, R. (2011). "Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste". In: *Enzyme and Microbial Technology*. 49: 567–573.

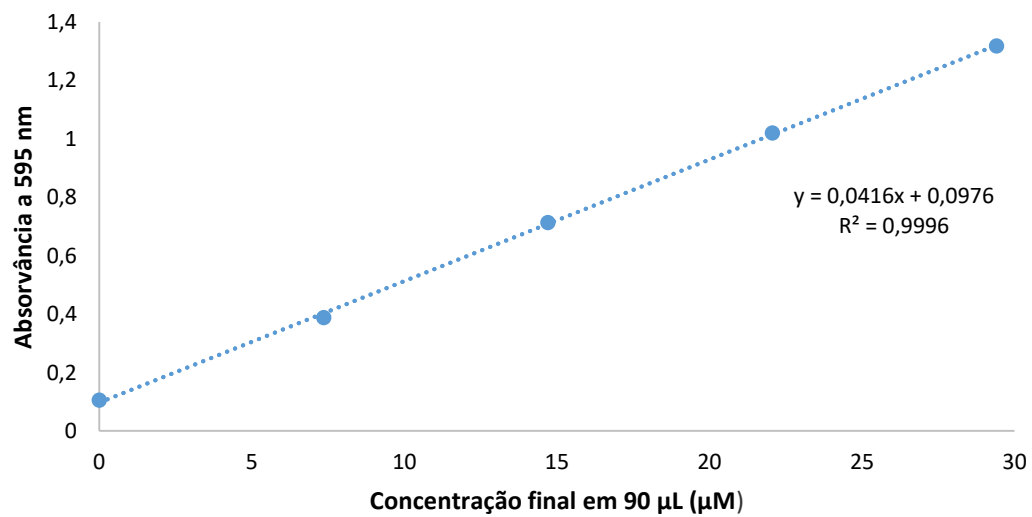
Anexos

Anexo I. Caracterização da farinha e do extrato de repiso de tomate

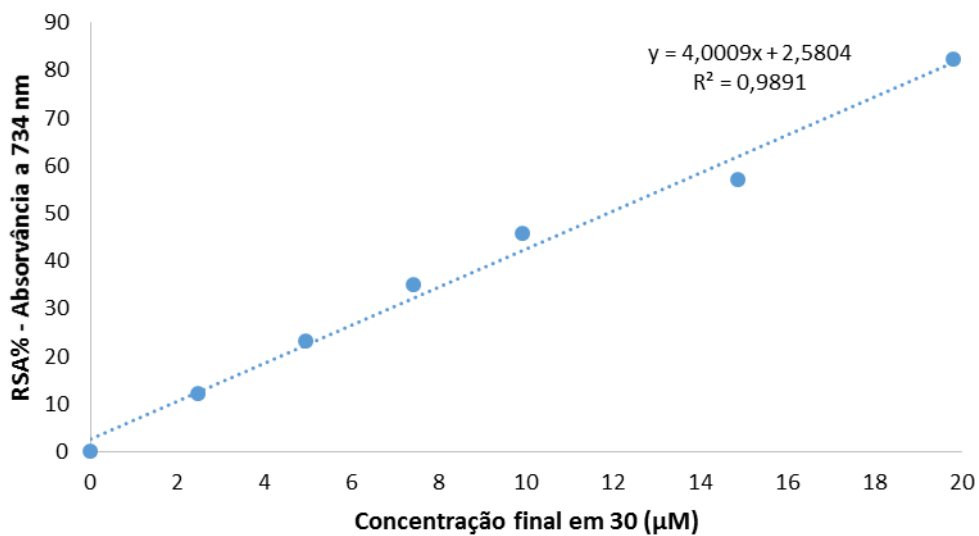
Curva de calibração trolox com DPPH



Curva de calibração trolox com FRAP

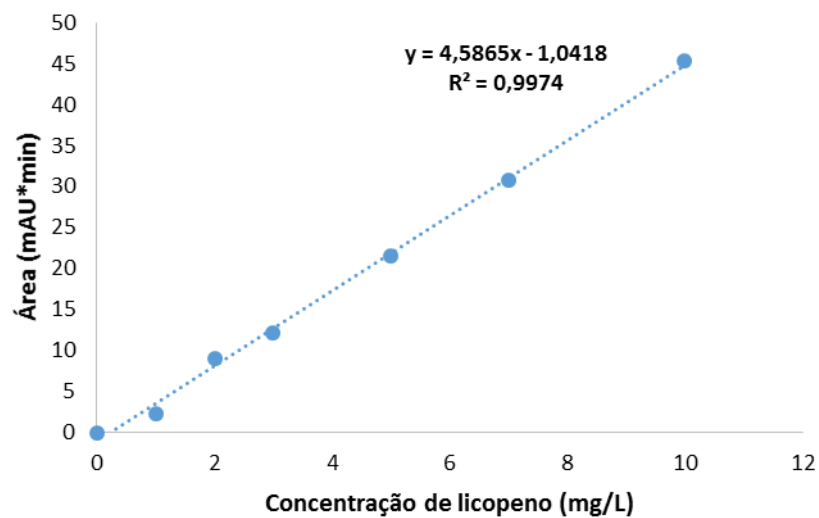


Curva de calibração trolox com ABTS

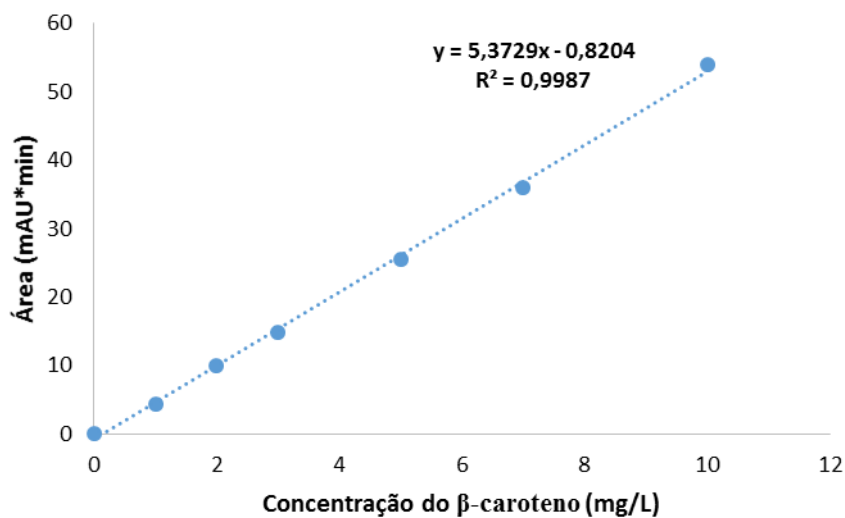


Anexo II. Caracterização do extrato de repiso de tomate concentrado

Curva de calibração do licopeno



Curva de calibração do β -caroteno



Anexo III. Caracterização das micropartículas de GA com β -caroteno

Curva de calibração do β -caroteno

